



**KAMMIOSSA LASKETTAVISTA
PUNKTIONESTEISTÄ TEHTÄVIEN
SOLUTUTKIMUSTEN TULOSTEN VERTAILU
SYSMEX XE-5000 -ANALYSAATTORILLA
SAATUIHIN TULOKSIIN**

Anne Paananen

Katri Puustinen

Opinnäytetyö
Lokakuu 2011
Bioanalytiikan koulutusohjelma
Tampereen ammattikorkeakoulu

TAMPEREEN AMMATTIKORKEAKOULU

Tampere University of Applied Sciences

TIIVISTELMÄ

Tampereen ammattikorkeakoulu
Bioanalytiikan koulutusohjelma
K08MBIOAN

PAANANEN, ANNE & PUUSTINEN, KATRI:

Kammiossa laskettavista punktionesteistä tehtävien solututkimusten tulosten vertailu Sysmex XE-5000 -analysaattorilla saatuihin tuloksiin

Opinnäytetyö 72 s., liitteet 13 s.

Lokakuu 2011

Solulaskenta on punktionesteistä tehtävä rutiinitutkimus ja tulosten nopea saanti on potilaan hoidon kannalta tärkeää. Solut lasketaan laskentakammiossa, mikä on aikaa vievää ja vaatii ammattitaitoa. Punktionesteiden soluja voidaan laskea myös uusimmilla verenkuvaa-analysaattoreilla. Opinnäytetyön tarkoituksena on vertailla punktionesteistä tehtävien, kammiossa laskettavien solututkimusten tuloksia Sysmex XE-5000 -analysaattorilla saatuihin tuloksiin. Opinnäytetyön tavoitteena on tuottaa tietoa Seinäjoen keskussairaalan klinisen kemian yksikön henkilökunnalle, jotta he voivat selvittää, onko mahdollista siirtyä punktionesteiden tutkimisesta kammiolaskennasta Sysmex XE-5000 -analysaattorin käyttöön.

Opinnäytetyön aihe saatiin Seinäjoen klinisen kemian yksiköstä. Aihe rajattiin koskemaan selkäydinneste- ja nivelnestenäytteitä. Raporttiosuudessa käsitellään kammiolaskentaa, Sysmex XE-5000 -analysaattoria, selkäydin- ja nivelnestettä sekä niistä tehtäviä tutkimuksia. Opinnäytetyö on kokeellinen ja vertaileva tutkimus. Kokeellisessa osuudessa selkäydin- ja nivelnestenäytteen solut laskettiin kammiolaskentana ja Sysmex XE-5000 -analysaattorilla. Seinäjoen klinisen kemian yksikön henkilökunta analysoi näytteet työohjeiden mukaan ja saadut tulokset kirjattiin havainnointilomakkeelle. Tulokset analysoitiin regressiosuorien, korrelaatioiden ja keskiarvoanalyysien avulla.

Vertailuun saatiin mukaan 18 selkäydinneste- ja 18 nivelnestenäytettä. Pienestä otoskoosta johtuen saadut tulokset ovat vain suuntaa antavia, mutta kammiolaskennan ja Sysmex XE-5000 -analysaattorin tulosten välillä havaittiin joitakin viitteitä lineaarisesta riippuvuudesta. Solumääriltään keskitasoiset näytteet puuttuivat otoksesta lähes kokonaan ja yksittäiset solumääriltään korkeat näytteet vääristivät saatuja tuloksia. Sysmex XE-5000 -analysaattori ilmoittaa erytrosyyttilaskennan tuloksen mittayksikössä $10^6/\mu\text{l}$, kun taas kammiolaskennan vastaus on muotoa $10^6/\text{l}$. Sysmex XE-5000 -analysaattorin mittayksiköstä johtuen näytteiden matalat erytrosyyttimäärät jäivät vastaamatta. Matalien erytrosyyttimäärien löytäminen olisi kuitenkin potilaan hoidon kannalta tärkeää.

Asiasanat: solulaskenta, selkäydinneste, nivelneste, laskentakammio, Sysmex XE-5000 -analysaattori.

ABSTRACT

Tampereen ammattikorkeakoulu
Tampere University of Applied Sciences
Degree Programme in Biomedical Laboratory Science
K08MBIOAN

PAANANEN, ANNE & PUUSTINEN, KATRI:

Comparison of the Cell Count Results in Body Fluids between Counting Chamber and Sysmex XE-5000 Haematology Analyzer

Bachelor's thesis 72 pages, appendices 13 pages
October 2011

Cell count is a routine examination of body fluids. Usually the cells are counted in a counting chamber, which is time consuming and requires a lot of experience. It is also possible to count cells from body fluids with some of the latest haematology analyzers. The aim of this study was to collect information for the personnel of clinical chemistry laboratory in Seinäjoki Central Hospital of the South Ostrobothnia Hospital District. Based on the gathered information they could decide if it is possible to do cell count of body fluids with Sysmex XE-5000 haematology analyzer in the future. The purpose of this thesis was to compare cell count results of body fluids between counting chamber and Sysmex XE-5000 haematology analyzer.

This study is comparative and experimental in nature. The sample of the study consisted of 18 cerebrospinal fluids and 18 synovial fluids. The data were analysed by means of regression, correlation and mean analysis. In the sample there were a lot of specimens that contained only small amount of cells and a few that contained large amount of cells. The unit of measure in erythrocyte count with Sysmex XE-5000 haematology analyzer is $10^6/\mu\text{l}$ and the result with counting chamber is $10^6/\text{l}$. Because Sysmex XE-5000 haematology analyzer has a small unit of measure, low amounts of erythrocytes are not reported. The sample of the study is small and therefore the results are not reliable.

Key words: Cell count, cerebrospinal fluid, synovial fluid, counting chamber, Sysmex XE-5000 haematology analyzer.

SISÄLTÖ

1 JOHDANTO	5
2 PUNKTIONESTEET	7
2.1 Selkäydinneste	7
2.1.1 Selkäydinnesteen tutkimusindikaatiot	9
2.1.2 Selkäydinnesteen näytteenotto	9
2.1.3 Selkäydinnesteen ulkonäkö	10
2.1.4 Selkäydinnesteen solulaskenta	10
2.1.5 Muut tutkimukset selkäydinnesteestä	12
2.2 Nivelneste	13
2.2.1 Nivelnesteen tutkimusindikaatiot	15
2.2.2 Nivelneste näytteenotto	15
2.2.3 Nivelnesteen ulkonäkö	16
2.2.4 Nivelnesteen solulaskenta	17
2.2.5 Muut tutkimukset nivelnesteestä	18
3 PUNKTIONESTEIDEN MÄÄRITYSMENETELMIÄ	20
3.1 Kammiolaskenta	20
3.2 Sysmex XE-5000 -analysaattori	22
3.2.1 Virtaussytometria ja impedanssimittaus	24
3.2.2 Käytettävät reagenssit	26
3.3 Laadunarviointi	28
4 AIKAISEMMAT TUTKIMUKSET	30
5 TUTKIMUKSEN TARKOITUS, TAVOITE JA TEHTÄVÄT	33
6 TUTKIMUSMENETELMÄ JA AINEISTON ANALYSOINTIMENETELMÄT	34
6.1 Tutkimusmenetelmä	34
6.2 Tilastolliset analysointimenetelmät	35
7 OPINNÄYTETYÖN PROSESSI	38
7.1 Kokeellinen osuus	39
7.2 Aineiston käsittely	41
8 VERTAILUN TULOKSET JA JOHTOPÄÄTÖKSET	43
9 POHDINTA	52
LÄHTEET	57
LIITEET	60

1 JOHDANTO

Punktionesteitä tutkitaan erilaisissa tautitiloissa ja sairauksien diagnosoinnin yhteydessä. Punktionestetutkimukset ovat usein päivystystutkimuksia ja tulosten nopea saanti on potilaan hoidon kannalta tärkeää. Punktionesteille voidaan tehdä kemiallisia ja mikrobiologisia tutkimuksia sekä solu- ja erittelylaskentaa tutkimusindikaatiosta riippuen. Selkäydinnestettä tutkitaan epäiltäessä aivokalvontulehdusta, vuotoa subaraknoidaalitilaan tai kasvainta. Nivelnestettä voidaan tutkia vain tulehduksen tai vamman yhteydessä, kun sen määrä on lisääntynyt. (Collins 2009, 45; Strasinger & Di Lorenzo 2001, 150.)

Etelä-Pohjanmaan sairaanhoitopiirin klinisen kemian yksikkö tuottaa laboratoriopalveluja erikoissairaanhoidolle ja sairaanhoitopiirin perusterveydenhuollolle. Klinisen kemian laboratorio toimii ympäri vuorokauden ja tarjoaa laajan valikoiman päivystystutkimuksia. (Etelä-Pohjanmaan sairaanhoitopiiri 2010.) Seinäjoen keskussairaalan klinisen kemian yksikössä punktionesteistä tehdään solulaskentaa ja kemiallisia tutkimuksia. Punktionesteiden solut lasketaan Bürkerin laskentakammiossa. Laskenta on runsaasti työaikaa vievää ja vaatii paljon kokemusta. Päivystysaikanaakin tulosten olisi valmistuttava nopeasti.

Seinäjoen keskussairaalan klinisen kemian yksikköön hankittiin vuoden 2011 alussa uudet Sysmex XE-5000 verenkuva-analysaattorit, joilla on mahdollista analysoida myös punktionesteitä. Henkilökunnan perehdyttäminen uuden laitteen käyttöön ja kontrollien asianmukainen määrittäminen näytteiden analysoinnin yhteydessä on edellytys luotettavien tulosten saamiseksi. Opinnäytetyömme tarkoituksena on vertailla punktionesteistä tehtävien, kammiossa laskettavien solututkimusten tuloksia Sysmex XE-5000 -analysaattorilla saatuihin tuloksiin. Tavoitteena on tuottaa tietoa klinisen kemian yksikön henkilökunnalle, jotta he voivat selvittää, onko mahdollista siirtyä punktionesteiden tutkimisessa kammiolaskennasta Sysmex XE-5000 -analysaattorin käyttöön. Selvitämme myös millä mittausperiaatteilla Sysmex XE-5000 -analysaattori toimii punktionestemittauksissa.

Bioanalyttikko-opintojemme aikana emme päässeet tekemään punktionestetutkimuksia ja halusimme syventää tietämystämme punktionesteistä ja niiden tutkimuksista. Myös menetelmävertailun tekeminen vaikutti kiinnostavalta. Aiheen opinnäytetyöhömme saimme ylikemisti Kari Åkermanilta Seinäjoen keskussairaalan kliinisen kemian laboratoriosta. Työmme on suunnattu Seinäjoen keskussairaalan kliinisen kemian laboratorion henkilökunnalle ja myös muille kliinisille laboratorioille, jotka ovat kiinnostuneita punktionestetutkimusten kehittämisestä.

Työssämme emme käsittele Sysmex XE 5000 -analysaattorin ominaisuuksia verenkuvatutkimuksissa. Työmme rajasimme koskemaan selkäydinneste- ja nivelnestenäytteitä, koska halusimme vertailla erityyppisiä nesteitä ja näitä punktionäytteitä analysoidaan Seinäjoella kuukausittain eniten. Työn ulkopuolelle rajasimme leukosyyttien erittelylaskennan. Leukosyyttien ja erytrosyyttien kammiolaskennan ja Sysmex XE-5000 -analysaattorin antamien tulosten vertailu ja teorian kirjoittaminen oli riittävän laaja aihealue. Teoriaosuudessa käsittelemme selkäydin- ja nivelnesteitä, niiden syntyä ja niistä tehtäviä tutkimuksia. Lisäksi käsittelemme punktionesteiden määrittämismenetelmistä kammiolaskentaa sekä Sysmex XE-5000 -analysaattoria. Työssämme selvitämme, ovatko selkäydin- ja nivelnestenäytteet tutkittavissa Sysmex XE-5000 -analysaattorilla ja kuinka näytteiden koostumus vaikuttaa tutkittavuuteen. Kokeellinen osuus käsittelee nivel- tai selkäydinnestenäytteen analysoinnin kahdella eri menetelmällä. Tuloksia tarkastelemme tilastollisten menetelmien avulla. Työssämme keskeisiä käsitteitä ovat selkäydin- ja nivelneste, kammiolaskenta ja Sysmex XE-5000 -analysaattori.

2 PUNKTIONESTEET

Elimistön solunulkoisista nesteistä voidaan ottaa punktionäytteitä. Solunulkoisia nesteitä ovat plasman lisäksi interstitiaalinesteet kuten pleura-, nivel- ja peritoneaalinesteet sekä transsellulaarinesteet kuten selkäydinneste ja silmävesi. Punktionesteitä voidaan tutkia makroskooppisesti arvioimalla määrää, ulkonäköä ja hajua, mikroskooppisesti laskemalla soluja ja partikkeleita sekä kemiallisin ja mikrobiologisin menetelmin. (Lalla 2002, 42.) Punktionesteillä tarkoitetaan kehon onteloissa olevia nesteitä, joista voidaan ottaa näyte punktoimalla.

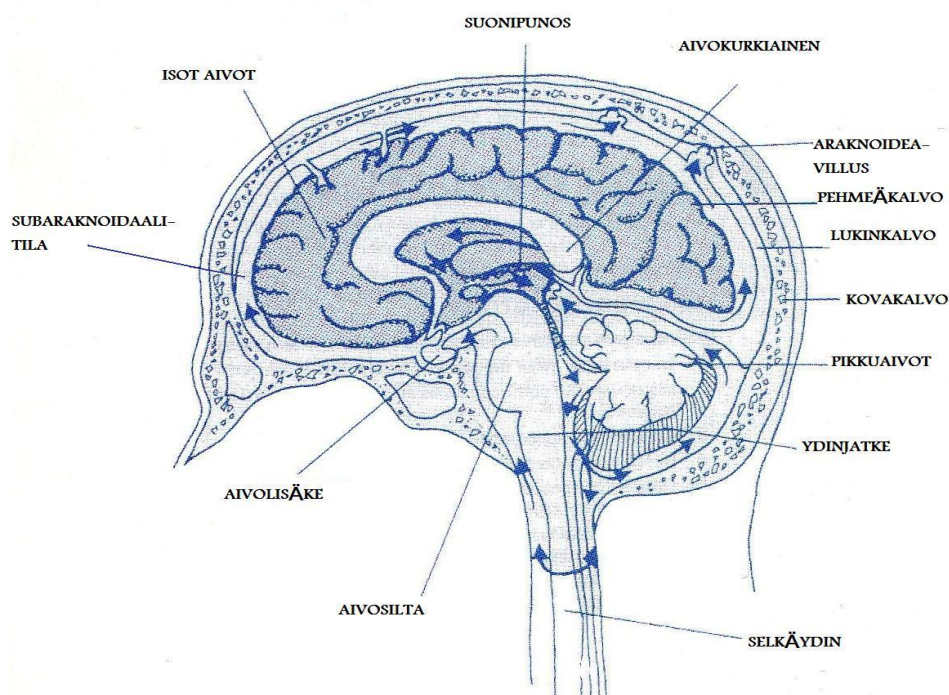
Punktionesteiden solututkimuksista yleisimpiä ovat leukosyyttien ja erytrosyyttien lukumäärän laskeminen sekä leukosyyttien erittelylaskenta. Solumäärien laskenta tehdään tuoreesta natiivinäytteestä yleensä kammiolaskentana tai May Grünwald Giemsa- eli MGG-värijätystä sivelyvalmisteesta. Keskeistä punktionesteiden solututkimuksissa on se, että näyte saadaan laboratorioon mahdollisimman pian. Punktionestenäytteissä solut hajoavat herkästi, joten luotettavan informaation saamiseksi solut on tutkittava 1 - 2 tunnin kuluessa näytteenotosta. (Tienhaara 2002, 43.)

2.1 Selkäydinneste

Selkäydinnesteen tehtäviin kuuluu ravinteiden kuljetus hermokudokselle, aineenvaihdunnan tuotteiden poistaminen ja aivojen suojaaminen iskuilta. Aivoja ja selkäydintä ympäröi kolme kerrosta aivokalvoja; pehmeä kalvo, lukinkalvo ja kovakalvo. Lukinkalvon ja pehmeän kalvon väliin jää subaraknoidaalitila, jossa selkäydinneste virtaa ja ympäröi aivoja ja selkäydintä. (Strasinger & Di Lorenzo 2001, 150.)

Selkäydinneste syntyy pääosin aivokammioissa, pieni osa on peräisin aivojen soluväliaineesta (Tienhaara 2002, 44). Aivokammioiden suonipunokset muodostavat selkäydinnestettä aktiivisesti erittämällä ja passiivisesti suodattamalla. Vuorokaudessa sitä muodostuu yhteensä noin 500 ml, joten selkäydinneste uusiutuu 4 - 6 tunnin välein. (Pirttilä & Oksi 2001, 1621.) Selkäydinnesteen määrä

on noin 140 – 170 ml ja se pysyy aikuisilla vakiona, koska sitä reabsorboituu jatkuvasti araknoideavillusten eli lukinkalvojuvästen kautta (Strasinger & Di Lorenzo 2001, 150.) Suonipunosten kautta selkäydinneste kulkeutuu aivokudoksesta aivokammioihin, josta se pääsee subaraknoidaalitilaan aivojen ja selkäytimen ympärille. Subaraknoidaalitilasta selkäydinnestettä poistuu lukinkalvojuvästen kautta kovakalvon lehtien välissä oleviin veriviemäriin ja sitä kautta verenkiertoon (kuvio 1) (Pirttilä & Oksi 2001, 1621; Strasinger & Di Lorenzo 2001, 150).



KUVIO 1. Aivojen rakenne (Mukaillen Strasinger & Di Lorenzo 2001, 150)

Suurin osa selkäydinnesteestä syntyy veren ultrafiltraattina, mutta veressä kiertävien makromolekyylien pääsyä hermoston alueelle rajoittavat normaalisti veriselkäydinneste-, veri-aivo- ja verihermoeste. Jotkin veren tekijät pääsevät selkäydinnesteeseen diffundoitumalla, ja monille aineille on olemassa aktiivisia ja saturoituvia eli kyllästyviä kuljetusjärjestelmiä. (Pirttilä & Oksi 2001, 1621.) Edellä mainitut tekijät estävät aineiden vapaan kulun, joten selkäydinnesteen kemiallinen koostumus eroaa plasman koostumuksesta (Strasinger & Di Lorenzo 2001, 150). Selkäydinnesteessä on normaalisti vain hyvin vähän proteiineja ja immunoglobuliineja sekä glukoosi- ja laktaattitaso on matalampi kuin plasmassa. Selkäydinnesteen proteiineista noin 80 % on suodattunut verestä ja 20 % on syntynyt aivojen alueella. Osa selkäydinnesteestä muodostuu aivojen soluväli-

aineesta ja sen mukana kulkeutuu aivoissa tuotettuja aineita selkäydinnestetiin. Siten selkäydinneste tarjoaa mahdollisuuden selvittää aivojen toiminnan muutoksia. (Pirttilä & Oksi 2001, 1621; Strasinger & Di Lorenzo 2001, 160 - 162.)

2.1.1 Selkäydinnesteen tutkimusindikaatiot

Aivokalvontulehdus- eli meningiittiepäilyssä diagnoosi voidaan tehdä vain tutkimalla selkäydinneste. Korkea kuume, päänsärky, tajunnan häiriöt ja niskan jäykkyys sekä yleiskunnon romahdus ovat tyypillisiä bakteerin aiheuttaman aivokalvontulehduksen oireita. Bakteerin aiheuttama aivokalvontulehdus on hengenvaarallinen tila ja vaatii kiireellisen antibioottihoidon. Aivokalvontulehduksen voi aiheuttaa myös virus, sieni tai ameba. (Lumio 2010.) Leukosyyttien määrittäminen ja erittelylaskennasta saadaan yleensä nopeimmin viite taudin aiheuttajasta (Pirttilä & Oksi 2001, 1624). Selkäydinnesteenäyte on aina käsiteltävä ja tutkittava välittömästi näytteen huonon säilyvyyden ja usein potilaan hoidon kiireellisyyden takia. Selkäydinnestettä tutkitaan myös kun epäillään kasvainta tai verenvuotoa subaraknoidaalitilaan. Yleensä näytettä otetaan kolmeen steriiliin putkeen, mutta vuotoepäilyissä näytettä tulisi olla useammassa putkessa. (Brunzel 2004, 328; Li-perustutkimukset, työohje 2009; Tienhaara 2002, 44.)

2.1.2 Selkäydinnesteen näytteenotto

Selkäydinnesteenäyte otetaan lannepistolla, joka on invasiivinen toimenpide. Vasta-aihe toimenpiteen suorittamiselle on selvästi kohonnut aivopaine. (Lumio 2010.) Lannepiston ajankohta suhteessa aivojen alueen tapahtumiin vaikuttaa selkäydinnesteanalyysien tuloksiin (Pirttilä & Oksi 2001, 1621). Mikäli halutaan verrata selkäydinnesteen ja plasman välisiä pitoisuuksia, tulisi verinäyte ottaa noin kaksi tuntia ennen selkäydinnesteenäytteenottoa. Selkäydinnesteenäyte otetaan tavallisimmin lumbaalipunktiona eli lannepistona kolmannen, neljännen tai viidennen lannenikaman välistä. Näytettä otetaan yleensä kolmeen putkeen, jotka merkitään numeroilla yhdestä kolmeen näytteenottojärjestyksessä. Putkista tehdään kemialliset, serologiset ja mikrobiologiset tutkimukset. Putkea kolme

käytetään solulaskentaan vuotoartefaktoiden välttämiseksi. Ihokontaminaation välttämiseksi viimeistä putkea voi käyttää myös mikrobiologisiin tutkimuksiin. (Strasinger & Di Lorenzo 2001, 150, 162.)

2.1.3 Selkäydinnesteen ulkonäkö

Selkäydinnesteen pitäisi normaalisti olla kirkasta ja väritöntä, mutta sen ulkonäkö voi olla joskus poikkeava. Selkäydinnesteen kirkkaus riippuu siinä olevasta solumäärästä ja sen väri voi vaihdella erilaisten tautitilojen yhteydessä. Esimerkiksi veri muuttaa selkäydinnesteen punertavaksi ja bilirubiini kellertäväksi. Selkäydinnesteen solut -tutkimukseen sisältyy myös näytteen sameuden ja värin silmämääräinen arviointi. Sameus vastataan numeroilla 0 - 3, jossa nolla tarkoittaa kirkasta. Näytettä tarkastellaan ennen ja jälkeen sentrifugoinnin ja molemmat tulokset kirjataan Effica-tietojärjestelmään. Vastaus voi olla esimerkiksi 3/1, jolloin näyte on ollut ennen sentrifugointia hyvin samea ja sen jälkeen vain hie-man samea. (Brunzel 2004, 328 - 329; Li-perustutkimukset, työohje 2009.)

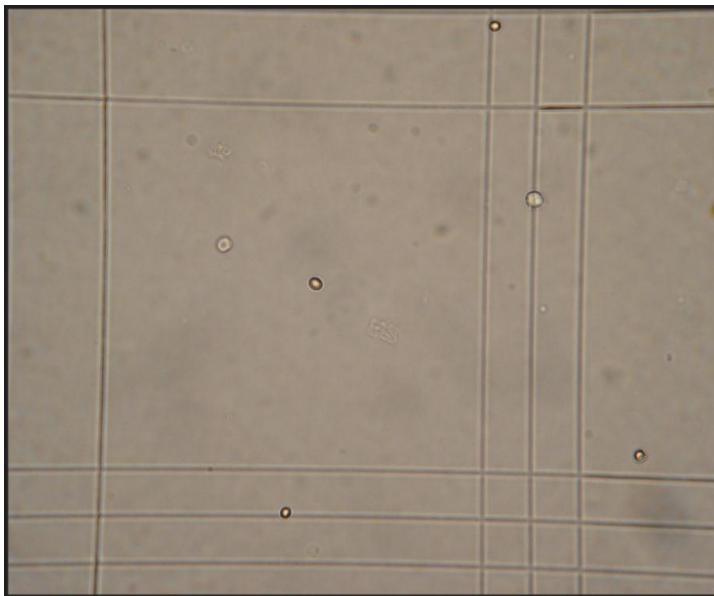
Myös väri arvioidaan ennen ja jälkeen sentrifugoinnin. Värin voimakkuus ilmoitetaan numeroilla 1 - 3. Värivaihtoehtoja ovat väritön, kellertävä, keltainen, punertava, punainen ja ruskea. Esimerkiksi jos ennen sentrifugointia näyte on verinen ja sentrifugoinnin jälkeen ruskea, on vastaus muotoa ve2/ru1. Mahdolliset muut poikkeavat löydökset selkäydinnesteen ulkonäössä voidaan vastata Effica-tietojärjestelmään huomautuksena. (Li-perustutkimukset, työohje 2009.)

2.1.4 Selkäydinnesteen solulaskenta

Selkäydinnesteessä on tavallisesti hyvin vähän leukosyyttejä eikä lainkaan erytrosyyttejä. Normaalissa selkäydinnesteessä leukosyyteistä suurin osa on lymfosyyttejä ja monosyyttejä. Aikuisilla lymfosyyttien osuus on suurempi, mutta lapsilla valtaosa soluista on monosyyttejä. Solujen lisääntynyt määrä, varhaismuotojen ja malignien solujen havaitsemista pidetään merkitseväenä löydöksenä. Tällaisista näytteistä tehdään yleensä leukosyyttien erittelylaskenta, joka

antaa lisätietoa siitä, mikä muutoksen on aiheuttanut. (Strasinger & Di Lorenzo 2001, 154; Tienhaara 2002, 44.)

Solujen kokonaismäärän laskeminen on selkäydinnesteen rutiinitutkimus. Solut lasketaan hyvin sekoitetusta natiivinäytteestä mahdollisimman pian näytteenoton jälkeen, viimeistään tunnin kuluessa, ennen kuin solut alkavat hajota. Solulaskenta suoritetaan yleensä kammiolaskentana (kuvio 2), koska analysaattoreiden suorittamat punktionestetutkimukset eivät ole käytössä taustavirheiden ja huonon luotettavuuden takia. Analysaattoreiden virhelähteitä on kuitenkin saatu eliminoidua ja osa niistä alkaa olla niin luotettavia, että automatisoituun solulaskentaan siirtyminen on mahdollista myös selkäydinnesteen osalta. (Strasinger & Di Lorenzo 2001, 152.) Solulaskenta suoritetaan yleensä putkesta numero kolme. Erytrosyytit ja leukosyytit tutkitaan samasta putkesta, josta tehdään myös mahdollinen sivelyvalmiste leukosyyttien erittelylaskentaa varten. Vuotoepäilyssä solut lasketaan useammasta tai tarvittaessa jokaisesta putkesta, jotta artefaktaveren mahdollisuus pois suljetaan. Artefaktaveri myös hyytyy nopeasti. Jos näyteputket ovat verisiä, on useimmiten syytä laskea solut kaikista putkista. (Brunzel 2004, 328 - 330; Li-perustutkimukset, työohje 2009; Lalla 2002, 43.)



KUVIO 2. Leukosyyttejä ja erytrosyyttejä laskentakammiossa (Janatuinen 2006)

Seinäjoen keskussairaalan klinisen kemian yksikössä solulaskenta suoritetaan mikroskoopilla kammiolaskentana Bürkerin laskukammiossa. Bürkerin kammiosta lasketaan kymmenen A-ruutua. Saatu tulos on solujen lukumäärä $\text{kpl} \times 10^6 / \text{l}$. Normaalissa selkäydinnesteessä tulisi olla erytrosyyttejä alle $2 \times 10^6 / \text{l}$, leukosyyttejä alle $5 \times 10^6 / \text{l}$. Kirkkaat näytteet voidaan tutkia laimentamattomina, sillä vähäisen solumäärän takia leukosyytit eivät jää kammiossa päällekkäin ja solulaskenta on mahdollista. Mahdollinen laimennus tulee huomioida lopullisessa vastauksessa. (Strasinger & Di Lorenzo 2001, 153; Li-perustutkimukset, työohje 2009.)

2.1.5 Muut tutkimukset selkäydinnesteestä

Jos leukosyyttien määrä selkäydinnesteessä on yli $20 \times 10^6 / \text{l}$, tehdään solujen erittelylaskenta (Li-perustutkimukset, työohje 2009). Solujen erittelylaskentaa varten voidaan tehdä paksupisaravalmiste tai sivelyvalmiste suoraan näytteestä tai sivelyvalmiste sentrifugaatin pohjasakasta. Jos näytteessä on erittäin vähän leukosyyttejä, tehdään sivelyvalmiste pohjasakasta, jota varten näytettä sentrifugoidaan Eppendorf 5810R -sentrifugilla 5 minuuttia G-arvolla 400. Preparaatit tehdään kahdelle hiospäiselle lasille, jotka värjätään MGG-värjäyksellä. Sivelyvalmistesta lasketaan erikseen lymfosyyttien ja granulosyyttien määrä prosentteina. (Brunzel 2004, 332; Eppendorf 5810R sentrifugin käyttöohje 2010.)

Selkäydinnesteestä tehdään myös kemiallisia tutkimuksia, yleisimmät tutkimukset ovat glukoosi, selkäydinnesteen kokonaisproteiinit ja proteiinifraktiot. (Strasinger & Di Lorenzo 2001, 160; Brunzel 2004, 334.) Kemiallisia tutkimuksia varten selkäydinnesteenäytteitä sentrifugoidaan 10 minuuttia G-arvolla 2500, jotta solut saadaan putken pohjalle (Eppendorf 5810R sentrifugin käyttöohje 2010). Normaalisti selkäydinnesteessä on vain vähän proteiineja, mutta niiden määrä on kohonnut lapsilla ja vanhemmilla ihmisillä. Selkäydinnesteen proteiineja tutkitaan, kun halutaan saada tietoa veri-aivoesteen toiminnasta. Korkeita arvoja tavataan patologisissa tiloissa, kuten aivokalvontulehduksen yhteydessä, sillä se vaikuttaa veri-aivoesteen toimintaan, madaltuneita arvoja voi olla vuotojen yhteydessä. Selkäydinnesteen korkeat glukoosiarvot viittaavat lähinnä hyperglykemiaan. Matalien arvojen klininen merkitys on suurempi, sillä ne voivat vii-

tata hypoglykemiaan tai aivokalvontulehdukseen. (Strasinger & Di Lorenzo 2001, 160; Brunzel 2004, 334; Bishop, Fody & Schoeff 2005, 562.)

Mikrobiologiset tutkimukset ovat tärkeimpiä selkäydinnesteestä tehtäviä tutkimuksia, sillä niiden avulla saadaan diagnosoitua aivokalvontulehdus ja potilaan lääkitys voidaan aloittaa. Jos selkäydinnestettä on saatu kerättyä vain vähän, mikrobiologiset tutkimukset tehdään aina ensin, jotta näyte on varmasti steriiliä. Yleensä bakteeriviljelyyn käytetään toista tai kolmatta näyteputkea, sillä niissä ei ole niin suurella todennäköisyydellä ihokontaminaatiota kuin ensimmäisessä putkessa. Bakteeriviljely tehdään veri- ja suklaamaljoille. Viljelyn avulla saadaan erotettua yleisimmät aivokalvontulehdusta aiheuttavat bakteerit. Bakteerivärjäys on tutkimus, jolla saadaan alustava vastaus näytteestä nopeasti eteenpäin. Selkäydinnesteestä tehdään valmiste objektilasille ja näytteelle tehdään yleensä Gram-värjäys. (Brunzel 2004, 338 - 339.)

2.2 Nivelneste

Nivelneste on nivelien onkaloissa oleva viskoosi neste. Nivelissä olevat luut on reunustettu nivelrustolla ja erotettu onteloilla, joissa on nivelnestettä. (kuvio 3, sivu 14.) Nivelneste on tarkoitettu huolehtia nivelruston aineenvaihdunnasta. Rusto on verisuoneton, joten ravinteiden ja hapen saanti sekä kuona-aineiden poisto tapahtuvat nivelnesteeseen välityksellä. Nivelneste toimii myös voiteluaineena ja vähentää kitkaa rustopintojen välillä esimerkiksi juostessa. (Strasinger & Di Lorenzo 2001, 180.)



KUVIO 3. Nivelen rakenne (Mukaillen Clemente 1984, 282)

Nivelneste on pääosin plasman ultrafiltraattia. Se muodostuu plasman suodattua kapillaariseinämän ja nivelkalvon ekstrasellulaaritalan läpi nivelonteloon. Nivelkalvon läpi suodattuminen ei ole selektiivistä, ainoastaan suurimolekyyliset proteiinit eivät pääse läpi. Tästä johtuen nivelnesteeseen kemiallinen koostumus on lähellä plasmaa. Nivelkalvoa reunustavat solut, synoviosyytit, joita on kahta tyyppiä. Toiset syntetisoivat glykosaminoglykaaneja, kuten hyaluronihappoa, sekä pieniä määriä proteiineja nivelnesteeseen. Tämä yhdistelmä aiheuttaa nivelnesteeseen viskositeetin. (Strasinger & Di Lorenzo 2001, 180.) Toiset synoviosyytit fagosytoivat ja syntetisoivat hajottajaentsyymejä, kuten kollageenaasia, nivelnesteeseen ja vaikuttavat osaltaan ruston uudismuodostukseen (Brunzel 2004, 346).

Normaali nivelneste on kirkas, vaalean kellertävä ja viskoosi neste, joka ei hyydy (Nivelnestetutkimukset, työohje 2009; Brunzel 2004, 346). Normaalisti nivelnestettä on vain vähäinen määrä, sen leukosyyttien määrä on pieni, eikä erytrosyyttejä ole (Tienhaara 2002, 43 - 44). Se sisältää vain $10 - 200 \times 10^6/l$ leukosyyttiä, joista suurin osa on mononukleaarisia fagosyyttejä ja lymfosyyttejä. Granulosyyttien osuus on alle 25 %. Proteiinipitoisuus on 20 - 30 g/l, josta albumiinia on suhteellisesti enemmän kuin plasmassa. Nivelnesteessä ei normaalisti ole fibrinogeeniä eikä muita suurimolekyylisiä proteiineja. (Nivelnestetutkimukset, työohje 2009; Brunzel 2004, 346.) Virtsahappo- ja glukoosiarvot ovat verrattavissa plasman vastaaviin tasoihin, kun taas kokonaisproteiini- ja immu-

noglobuliinimäärät vaihtelevat 25 – 50 % plasman määristä. Normaali nivelneeste sisältää aina myös laktaattia ja hyaluronihappoa. (Brunzel 2004, 346.)

2.2.1 Nivelnesteen tutkimusindikaatiot

Artriitti on nivelen tulehdus tai vamma. Vaurio nivelkalvossa aiheuttaa artriitin oireita, kuten kipua ja nivelen jäykkyyttä. Nivelneestetutkimuksen tärkein kliininen merkitys on ei-tulehduksellisten artriittien; artroosi ja trauma, erottaminen tulehduksellisista artriiteista; kihti, nivelreuma ja infektiot. Myös spesifinen diagnoosi voi olla mahdollinen bakteerivärjäyksen ja -viljelyn tai kideanalyysin avulla. Pääpaino nivelneestetutkimuksissa on nivelnesteen ulkonäön tarkastelulla, solujen laskennalla ja erittelyllä, nivelnesteen kide tutkimuksella sekä bakteriologisilla tutkimuksilla. (Nivelneestetutkimukset, työohje 2009; Strasinger & Di Lorenzo 2001, 180).

2.2.2 Nivelneستنäytteenotto

Terveessä nivelneesteessä vallitsee alipaine ja nivelneeste on ohuena kerroksena ruston ja nivelkalvon pinnalla eikä sitä pystytä aspiroimaan. Kun nivelkalvo tuulehtuu, sen kapillaarien permeabiliteetti lisääntyy. Nivelnesteen solu- ja proteiinipitoisuus suurenee ja proteiinikoostumus muuttuu plasman kaltaiseksi. Samalla osmoottinen paine nousee, mikä vähentää veden poisvirtausta. Nivelen sisäinen paine lisääntyy ja nestettä voidaan aspiroida tutkittavaksi. (Risteli 2006, 57.)

Nivelneestetä kerätään aspiroimalla neulalla. Nesteiden määrä vaihtelee nivelen koosta ja nesteen muodostuksesta riippuen. Normaalisti nivelneeste ei hyydy, mutta vaurioituneesta nivelestä kerätty neste voi sisältää fibrinogeeniä ja siten myös hyytyä. Tämän vuoksi neste kerätään yleensä ruiskulla jossa on hepariinia. Näyte jaetaan kolmeen steriiliin putkeen. (Strasinger & Di Lorenzo 2001, 180 - 181.) Näytteet käsitellään ja tutkitaan kahden tunnin sisällä näytteenotosta, jotta solut eivät hajoaisi ja kiteet säilyisivät tunnistuskelpoisina. (Strasinger & Di Lorenzo 2001, 180 - 181; Nivelneestetutkimukset, työohje 2009.) Solut, sively-

valmiste ja kiteet tutkitaan hepariiniputkesta, sentrifugoimattomasta näytteestä. Sentrifugoidusta näytteestä tutkitaan glukoosi. Lisäaineettomasta sentrifugoidusta näytteestä tehdään muut kemialliset tutkimukset. (Nivelnestetutkimukset, työohje 2009; Brunzel 2004, 347.)

2.2.3 Nivelnesteen ulkonäkö

Nivelnesteen ulkonäön arviointi on osa analysointia. Nivelneste Solut -tutkimukseen sisältyy sameuden ja värin silmämääräinen arviointi. (Nivelnestetutkimukset, työohje 2009; Brunzel 2004, 347.) Sameus arvioidaan numeroilla 0 - 3, jossa nolla on kirkas ja kolme hyvin samea. Nivelneste värin arvioinnin vaihtoehtoina ovat väritön, kellertävä, keltainen, punertava, punainen ja ruskea. Mahdolliset muut poikkeavuudet nivelneste ulkonäössä vastataan Effica-tietojärjestelmän lausuntokenttään huomautuksena. (Nivelnestetutkimukset, työohje 2009.)

Normaalisti nivelneste on kirkasta ja vaalean keltaista. Keltainen väri yleensä syvenee, kun on kyse tulehduksesta. Bakteeritulehduksessa väri voi olla myös vihertävä. Jos nivelnesteessä on verta, tulee voida erottaa onko kyseessä näytteenoton yhteydessä tullut vuoto vai todellinen löydös. Veren epätasainen jakautuminen näytemateriaalissa kertoo, että kyseessä on aspiraation yhteydessä tapahtunut vuoto. (Strasinger & Di Lorenzo 2001, 181.)

Nivelneste silmämääräisessä tarkastelussa pannaan merkille myös sameusaste, jonka tärkein syy on lisääntyneet solut (Risteli 2006, 57). Yleensä näytteen sameus on yhteydessä leukosyyttien esiintymiseen. Kuitenkin myös synoviosyyttien jäänteet ja fibriini voivat aiheuttaa sameutta. Kiteet voivat aiheuttaa nivelnesteelle maitomaisen ulkonäön. Hyaluronihappo aiheuttaa nivelneste viskositeetin ja siten myös voitelukyvyn. Artriitti voi vaikuttaa hyaluronihapon muodostukseen ja lisätä nivelneste viskositeettia. (Strasinger & Di Lorenzo 2001, 181.)

2.2.4 Nivelnesteiden solulaskenta

Leukosyyttien määrä ja neutrofiilien osuus kertovat niveltulehduksen voimakkuudesta ja sitä kautta epäsuorasti myös aiheuttajasta. Ei-tulehduksellisissa tiloissa leukosyyttien määrä ja neutrofiilien osuus ovat pieniä, kun taas tulehduksellisissa tiloissa leukosyyttejä ja etenkin neutrofiilejä on runsaasti. Erytrosyyttejä voi olla runsaasti traumausten ja joskus myös hyytymien yhteydessä. (Tienhaara 2002, 43 - 44.) Leukosyyttimäärän perusteella nivelnesteet voidaan jakaa seuraavasti: normaalit alle $200 \times 10^6/l$, ei-tulehdukselliset 200 - $2000 \times 10^6/l$, tulehdukselliset 2000 - $60000 \times 10^6/l$ ja septiset yli $60000 \times 10^6/l$ (Risteli 2006, 57; Käypä Hoito. Nivelreuma 2009).

Solulaskenta tulisi tehdä mahdollisimman pian, jotta solut eivät ehtisi hajoaan. Hyvin sekoitettu natiivinäyte lasketaan kammiossa. Kirkkaat nesteet voidaan laskea yleensä laimentamatta, mutta laimennus voi olla tarpeen, jos näyte on samea, verinen tai sen viskositeetti on korkea. (Strasinger & Di Lorenzo 2001, 181 - 182.) Nivelnesteiden solujen kammiolaskennassa on otettava huomioon, että laimennusnesteinä on käytettävä fysiologista keittosuolaa, jotta hyaluronihappo ei saostuisi (Risteli 2006, 57).

Automaattisia solulaskimia voidaan käyttää nivelnesteiden solulaskentaan. Kuitenkin viskoosinen neste voi helposti tukkia aukot ja synoviosyyttien jäänteet ja muu solukko voi aiheuttaa virheellisiä tuloksia. Näytteen viskositeettiä voidaan kuitenkin vähentää. Jos solulaskentaan käytetään automaattista hematologista solulaskijaa, voi hyaluronidaasikäsittely olla tarpeen laitteen tukkeutumisen estämiseksi. (Risteli 2006, 57.) Sirontakuvioiden analysoinnin avulla voidaan havaita solujen jäänteet. Asianmukaisesti kontrolloidut automaattisolulaskimet tarjoavat paremman tarkkuuden kuin manuaalinen laskenta. (Strasinger & Di Lorenzo 2001, 181 - 182.)

Solulaskenta suoritetaan Seinäjoen keskussairaalan kliinisen kemian yksikössä hepariiniputkeen otetusta, hyvin sekoitetusta näytteestä mahdollisimman nopeasti ja viimeistään kahden tunnin kuluessa näytteenotosta. Nivelnesteestä lasketaan erytrosyyttien ja leukosyyttien määrät. Tutkimus suoritetaan mikroskooppilla kammiolaskentana Bürkerin laskukammiossa. Kammiolaskennan voi tarvit-

taessa suorittaa 0,9 % natriumkloridilla laimennetusta näytteestä. Bürkerin kammiosta lasketaan kymmenen A-ruutua. Saatu tulos on solujen lukumäärä $\text{kpl} \times 10^6 / \text{l}$. Mahdollinen laimennus tulee huomioida lopullisessa vastauksessa. (Nivelnestetutkimukset, työohje 2009; Brunzel 2004, 349 - 350.)

2.2.5 Muut tutkimukset nivelnesteestä

Nivelnestenäytteestä tehdään erittelylaskenta, jos leukosyyttejä on yli $2000 \times 10^6 / \text{l}$. Erittelylaskenta tehdään paksupisara- tai sivelyvalmisteesta, joko suoraan näytteestä tai sentrifugoimalla näyte. Näytettä sentrifugoidaan Eppendorf 5810R -sentrifugilla 5 minuuttia G-arvolla 400, jos näytteessä on vähän leukosyyttejä. (Eppendorf 5810R -sentrifugin käyttöohje 2010.) Mononukleaariset solut ja synoviosyytit ovat tavallisin löydös normaalissa nivelnesteessä. Synoviosyytit muistuttavat monosyyttejä, mutta niiden sytoplasma on laajempi ja ne esiintyvät usein muutaman solun rykelminä. Nivelnesteeseen tumalliset solut jaetaan tavallisesti liuskatumallisiin ja mononukleaarisiin soluihin, eikä tarkemmas- ta jaosta ole niveltautien rutiinidiagnostiikassa etua. (Risteli 2006, 57.)

Neutrofiilien kohonnut osuus, yli 20 %, kertoo septisestä tilasta, kun taas lymfositien ollessa vallitsevina, yli 15 %, on kyseessä ei-septinen tulehdus (Strasinger & Di Lorenzo 2001, 182; Nivelnestetutkimukset, työohje 2009). Erytrosyytit saattavat värjätä nivelnesteeseen punertavaksi. Yleisin syy erytrosyyttien esiintymiseen on trauma. (Risteli 2006, 57.) Nivelnestenäytteessä solut voivat olla vakuolisoituneempia kuin verestä tehdyssä sivelyvalmisteesta. Normaalien solulöydösten lisääntyneen määrän lisäksi nivelnesteestä voidaan löytää poikkeavia soluja, kuten eosinofiileja ja ragosyyttejä. Ragosyytit ovat liuskatumaaisia neutrofiileja, joilla on pieniä, mustia inklusiokappaleita sytoplasmassa. Niitä esiintyy etenkin nivelreumassa. (Strasinger & Di Lorenzo 2001, 182.)

Nivelnesteeseen mikroskooppinen tarkastelu kiteiden havaitsemiseksi on tärkeää artriitin diagnostiikan kannalta. Kiteiden jatkuva muodostuminen nivelessä aiheuttaa akuutin, kivuliaan tulehduksen. Kiteiden muodostus voi johtua metabolisista syistä tai munuaisten vähentyneestä kuonanerityksestä. Myös ruston tai luun uudismuodostus ja niveleen pistettävät lääkkeet kuten kortikosteroidit voivat

aiheuttaa kiteiden muodostusta. Tavallisimmin löydettäviä kiteitä ovat kihdissä esiintyvät natriumuraattikiteet ja pseudokihdissä kalsiumpyrofosfaattikiteet. Kihdi on uraatin metaboliaan liittyvä sairaus. (Strasinger & Di Lorenzo 2001, 182 - 183; Brunzel 2004, 330 - 331.)

Nivelnestenäytteitä sentrifugoidaan kemiallisia tutkimuksia varten 10 minuuttia G-arvolla 2500 (Eppendorf 5810R -sentrifugin käyttöohje 2010). Kemiallisista kokeista usein pyydetty tutkimus on glukoosi, koska madaltuneet arvot voivat merkitä tulehdusta. Normaalin nivelnesteen glukoosimäärä on samaa tasoa kuin veren glukoositaso. Nivelnesteen laktaatin mittausta voi olla myös hyödyllinen indikaatio tulehduksellisen ja septisen artriitin erottamisessa eikä vaadi vertausta veren laktaattipitoisuuksiin. Myös kokonaisproteiinimäärää ja uraatin määrää voidaan mitata. Suurikokoiset proteiinit eivät suodatu nivelkalvon läpi, joten nivelneste sisältää noin yhden kolmasosan plasman proteiinimäärästä. Kohonneita proteiiniarvoja tavataan tulehduksissa. Seerumin kohonnut uraattimäärä yhdistetään kihtiin ja nivelnesteen uraattimäärän avulla voidaan varmistaa diagnoosia, varsinkin jos kiteitä ei ole todettavissa. (Strasinger & Di Lorenzo 2001, 185.)

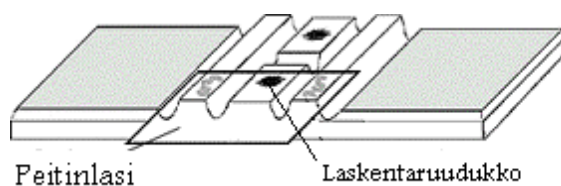
Gramvärjäys ja viljely ovat tärkeimpiä mikrobiologisia kokeita tulehduksen syyn osoittamiseksi. Yleisimmin näin voidaan osoittaa bakteeritulehduksia, mutta myös sieniä tai viruksia voi esiintyä. Koska immuunijärjestelmällä voi olla keskeinen merkitys tulehduksellisen tilan synnyssä, myös serologiset määritykset ovat merkittäviä niveloireiden diagnoosia tehtäessä. Suurin osa määrityksistä tehdään seerumista. Muun muassa nivelreuma aiheuttaa vaikeita tulehdusoireita nivelissä ja sen diagnoosi varmistetaan osoittamalla spesifisiä vasta-aineita potilaan verenkierrosta. Samoja vasta-aineita voidaan tarvittaessa osoittaa myös nivelnesteestä. (Strasinger & Di Lorenzo 2001, 186.)

3 PUNKTIONESTEIDEN MÄÄRITYSMENETELMIÄ

3.1 Kammiolaskenta

Kammiolaskennalla tarkoitetaan solujen laskemista tätä tarkoitusta varten valmistetun laskentakammion ja mikroskoopin avulla. Laskukammiota käytetään solujen ja partikkeleiden laskemiseen erilaisista kehon nesteistä. Yleisimmin laskukammiota käytetään veren- ja selkäydinnesteen solujen laskentaan, mutta sen avulla voidaan laskea soluja myös muista nestenäytteistä. (Savolainen 2010, 70; Lo-Laboroptik.) Selkäydinnesteen lisäksi soluja voidaan laskea myös muista punktionesteistä sekä dialyysinesteestä. Siemennestenäytteen konsentraatio lasketaan laskentakammiossa. Laskentakammiota käytetään myös soluviljelyssä viljelmän kasvun arvioinnissa. (Strasinger & Di Lorenzo 2001,171; Freshney 2005, 335.)

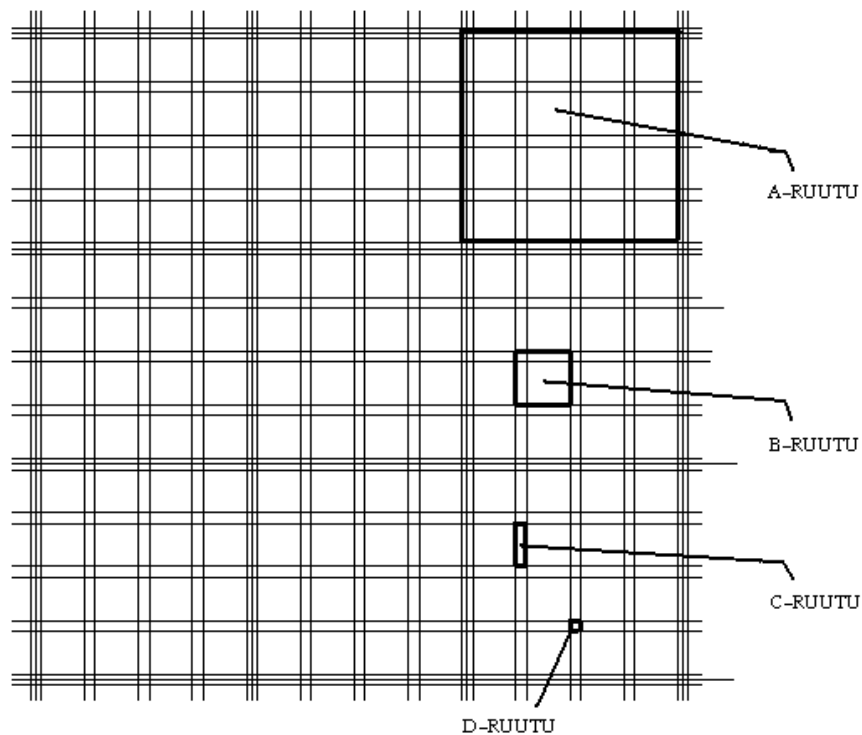
Kammion reunoja kastellaan hieman ja peitinlasi työnnetään paikoilleen. Peitinlasiä liikutellaan peukaloilla edestakaisin kammion reunojen päällä, kunnes se ei enää liiku, ja on asettunut hyvin molempien laskentakammioden päälle (kuvio 4). Peitinlasin kiinnittämisen jälkeen peitinlasin reunoilla tulisi näkyä valon heijastumisesta johtuvat Newtonin renkaat eli sateenkaarikuviot. (Lo-Laboroptik; Vilpo 2003, 65; Savolainen 2010, 70 - 71.) Kammio täytetään pipetin tai heparinisoimattoman kapillaarin avulla peitinlasin reunasta ja se asetetaan petrimaljan pohjalle kostutetun imupaperin päälle. Kammiota ei saa yli- tai alitäyttää. Jos kammiossa on ilmakuplia, se pitää täyttää uudelleen. Solujen annetaan laskeutua kammion pohjalle tasaisesti ennen laskemista noin kymmenen minuutin ajan. (Estridge & Reynolds 2008, 206, 225; Nivelnestetutkimukset, työohje 2009; Li-perustutkimukset, työohje 2009.)



KUVIO 4. Bürkerin laskukammio (Mukaillen Lo-laboroptik)

Tutkimuksen tekijän on osattava kammiolaskennan säännöt, jotta kammioiden reunaviivoille osuvia soluja ei laskettaisi useaan kertaan. Kammiolaskenta pitää suorittaa nopeasti, jotta kammio ei pääse kuivumaan, sillä kuivuminen voi vääristää tutkimuksen tuloksia. (Lo-laboroptik.) Solut lasketaan mikroskoopin avulla tietyltä alueelta, joka vastaa tiettyä tilavuutta. Tämän perusteella lasketaan solupitoisuus alkuperäisessä näytteessä. (Vilpo 2003, 65.)

Bürkerin kammiosta lasketaan kymmenen A-ruutua, eli toinen kenttä kokonaan ja toisesta kentästä yksi A-ruutu. Kammiolaskenta suoritetaan mikroskoopilla, 40 x objektiivilla ja 10 x okulaarilla Bürkerin laskukammista. (Nivelnestetutkimukset, työohje 2009.) Saatu tulos on solujen lukumäärä $\text{kpl} \times 10^6 / \text{l}$. Jos soluja on paljon voidaan laskea joko yksi A-ruutu, jolloin tulos kerrotaan kymmenellä, tai kahdeksan C+ D -ruutua, jolloin tulos kerrotaan sadalla (kuvio 5). Yksi A-ruutu on tilavuudeltaan $1/10 \text{ mm}^3$ eli $0,1 \mu\text{l}$. A-ruutuja lasketaan 10 kappaletta, jotta lopputilavuudeksi saadaan $1 \mu\text{l}$ eli $10^6 / \text{l}$. Tarvittaessa näyte voidaan myös laimentaa. Laimennus on huomioitava lopullista vastausta annettaessa. (Li-perustutkimukset, työohje 2009.)



KUVIO 5. Bürkerin kammion laskentaruudukko (Mukaillen Lo-laboroptik)

Heti kammiolaskennan jälkeen peitinlasi irrotetaan kammion päältä ja kammio puhdistetaan. Seinäjoen keskussairaalassa klinisen kemian yksikössä välinehuoltajat pesevät laskentakammiot. Käytön jälkeen kammiot laitetaan likoamaan kaksi prosenttiseen Decon 90-pesuaineveeteen vähintään puoleksi tunniksi. Sen jälkeen kammiot pestään kaksi prosenttisessa Decon 90-liuoksessa, joka toinen viikko käsin ja joka toinen viikko ultraäänipesukoneessa viiden minuutin ajan. Pestyt kammiot huuhdellaan juoksevalla vesijohtovedellä ja liuotetaan denaturoidussa spriissä eli A12T:ssä noin kymmenen minuutin ajan. Etanoliliuotuksen jälkeen kammiot huuhdellaan vesijohtovedellä ja lopuksi liuotetaan ultrapuhtaassa vedessä, joka on sekä käänteisosmoottisesti puhdistettua että ionivaihdettua. Lopuksi kammiot kuivataan hyvin ja säilytetään niin, etteivät ne pääse pölyyntymään. (Eritelaboratorion työohje, laskukammioiden pesu 2009.) Jos kammio on kuitenkin pölyyntynyt, sitä voi pyyhkiä linssipaperilla, joka ei naarmuta lasin pintaa (Lo-Laboroptik).

3.2 Sysmex XE-5000 -analysaattori

Verisolulaskenta on laboratorioissa yleisimmin tehtävä tutkimus. Automaattiset verisolulaskijat ovat kehittyneet: analyysitekniikat solujen tunnistamiseen ovat parantuneet, monipuolistuneet ja laitteiden ohjelmistot ovat kehittyneet. (Savolainen 2006, 14.) Verisolujen laskennassa kammiolaskenta on jäänyt pois ja korvautunut automaattisilla solulaskijoilla, joita on nykyisin tarjolla myös punktionesteiden solujen laskemiseen (Savolainen 2010, 70 - 71).

Solulaskijassa näyte ohjautuu analyysikanaville, joissa solujen tunnistus ja mitaus tapahtuvat. Yhdessä kanavassa lasketaan erytrosyyttien lukumäärä ja mitataan niiden koko ja toisessa kanavassa määritetään leukosyytit ja trombositit erytrosyyttien hajotuksen jälkeen sekä mitataan hemoglobiinipitoisuus. Kehittyneimmät solulaskijat tuottavat parhaimmillaan useita kymmeniä erilaisia erytrosyyttejä, leukosyyttejä ja trombosittejä kuvaavia suureita. (Savolainen, Pelliniemi & Koski 2010, 86 - 87.)

Sysmex XE-5000 on automaattinen hematologian analysaattori, joka on tarkoitettu *in vitro* diagnostiikkaan klinisiin laboratorioihin. Analysaattorilla on viisi mit-

tausohjelmaa verelle ja yksi punktionesteille. Sysmex XE-5000 -analysaattori voi analysoida ja tuottaa tulokset 76 parametrille. Analysaattori käyttää mittauskanavillaan erilaisia mittausmenetelmiä. Leukosyytit, erytroblastit ja retikulosyytit analysoidaan fluoresenssivirtausytometrialla käyttäen puolijohdelaseria. Erytrosyytit ja trombositit analysoidaan impedanssimittauksella, jossa käytetään hydrodynaamista fokusointia. Hemoglobiini analysoidaan natriumlauryylisulfaatti-hemoglobiininimenetelmällä mittaamalla absorbanssia. Epäkypsät solut analysoidaan käyttäen radiofrekvenssi/tasavirtamittausta ja fluoresenssivirtausytometriaa. Analysointitulokset näytetään analysaattorin näytöllä ja analysaattorin tietoja prosessoivassa ohjelmassa oheistietokoneella. (Roche Diagnostics Oy 2010, 3.)

Sysmex XE-5000 -analysaattorilla on punktionesteille oma ohjelmansa. Sysmex XE-5000 käyttää punktionesteiden leukosyyttien analysointiin fluoresenssivirtausytometriaa ja erytrosyyttien analysointiin impedanssimittausta. Laite antaa punktionesteistä tulokseksi kokonaisleukosyyttisolumäärän (WBC), mononukleaaristen (MN) ja polynukleaaristen (PMN) leukosyyttien määrän ja prosenttiosuudet sekä erytrosyyttien (RBC-BF) määrän punktionesteissä (taulukko 1). Erilaiset aspiraationäytteet kuten pleura, askites ja peritoneaalidialyysi sekä nivelneste ja selkäydinneste sopivat näytteeksi. Analyysi vaatii vähintään 500 µl näytetilavuuden, jotta tulokset olisivat luotettavia. Punktionesteet tulisi analysoida välittömästi näytteenoton jälkeen. Punktionesteanalyysia varten laitteelta on valittava punktionesteohjelma, Body Fluid Channel. (Roche Diagnostics Oy 2010, 11.)

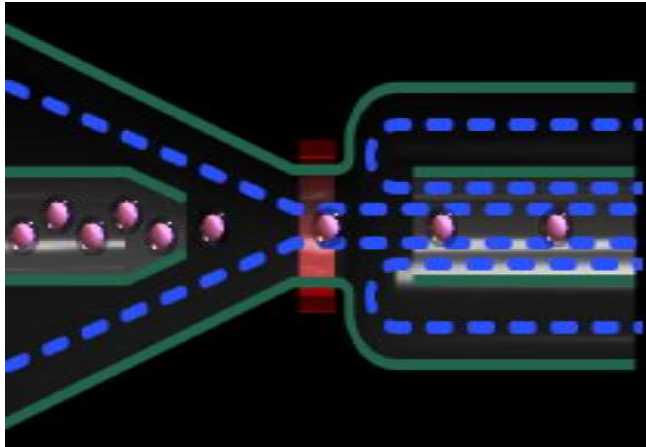
TAULUKKO 1. Sysmex XE-5000 -analysaattorin punktionesteparametrit
(Mukaillen Roche Diagnostics Oy 2010, 11)

Kokonaisleukosyyttimäärä $\times 10^6/l$	WBC-BF
Mononukleaaristen leukosyyttien määrä $\times 10^6/l$	MN#
Mononukleaaristen leukosyyttien prosenttiosuus	MN%
Polynukleaaristen leukosyyttien määrä $\times 10^6/l$	PMN#
Polynukleaaristen leukosyyttien prosenttiosuus	PMN%
Erytrosyyttien määrä $\times 10^6/\mu l$	RBC-BF

Punktionesteohjelman periaate on sama kuin verenkuvahjelman, mutta punktionesteiden kohdalla on erityisen tärkeää saada taustahäiriöt eliminoitua näytteiden mahdollisesti korkeiden solumäärien takia. Sen vuoksi taustan tarkistus tehdään aina automaattisesti. (Roche Diagnostics Oy 2010, 12.) Koska selkäydinnesteessä on normaalisti vain vähän soluja, eivät automaattiset solulasimet välttämättä anna luotettavia tuloksia. Soluautomaattien taustatarkistuksen rajat saattavat olla matalampia kuin selkäydinnesteen solumäärät, tämän takia solut voivat jäädä vastaamatta. (Brunzel 2004, 330.) Jos punktionesteen erytrosyytti- tai leukosyyttimittaus tulos on korkea, se voi vaikuttaa seuraavan näytteen tulokseen nostavasti. Tätä kutsutaan carry over -siirtymävirheeksi. Tällöin on suoritettava taustamittaus ennen seuraavan näytteen analysointia. Taustarvoja voidaan madaltaa myös suorittamalla laitteelle automaattinen huuhtelu eli *Auto Rinse* -toiminto. (Roche Diagnostics Oy 2010, 13.)

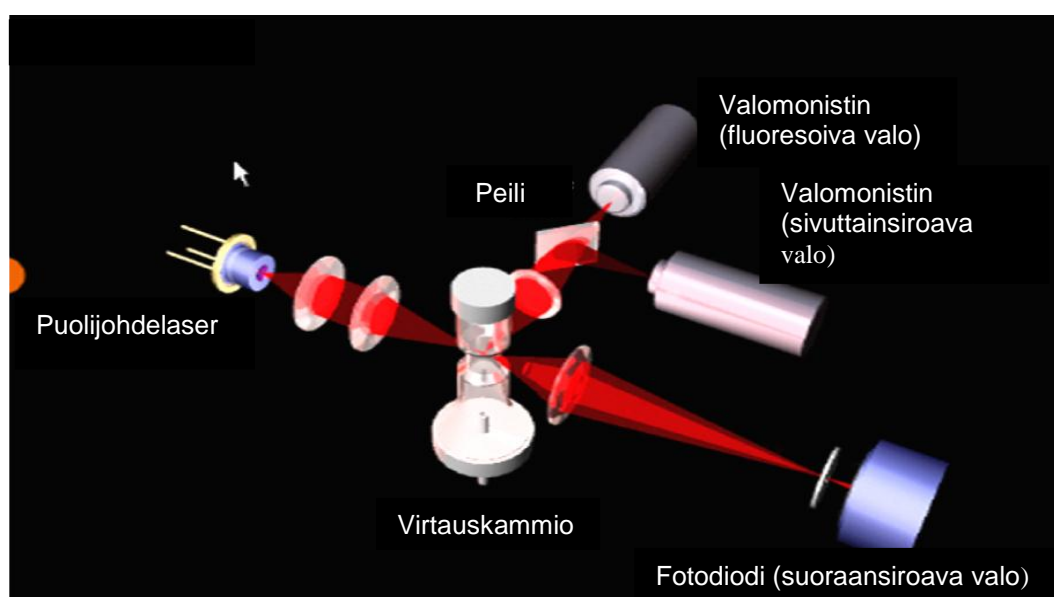
3.2.1 Virtausmittaus ja impedanssimittaus

Sysmex XE-5000 -analysaattorissa hyödynnetään muun muassa impedanssimittauksia ja fluoresenssivirtausmittauksia käyttäen valolähteenä laservaloa. Virtausmittauksissa ja impedanssimittauksessa käytetään apuna hydrodynamista fokuointia. Hydrodynaamisessa fokusoinnissa liuos ympäröi näytevirtaa ja solujen pyönteily takaisin mittausaukosta estyy. Tällöin sama solu ei tule mitattavaksi useaan kertaan. Solut keskitetään kulkemaan mittausaukossa yksitellen ja peräkkäin, joka estää tukosten syntyä ja mahdollistaa jokaisen solun yksittäisen mittauksen (kuvio 6, sivu 25). (Kuusela 2011, 25.) Virtausmittauksissa solususpensio kohdistetaan paineistetun vaipanesteen avulla virtaamaan yhden tai useamman lasersäteiden läpi (Savolainen ym. 2010, 87). Solujen siroamaa valoa mitataan kahdesta eri suunnasta. Pienen kulman valonsironta on verrannollinen solun kokoon ja sivusironta on verrannollinen solujen granulaarisuuteen, tuman monimuotoisuuteen sekä tuman ja sytoplasman suhteeseen. Sirontaominaisuuksien perusteella veren solut erottuvat lymfosyytteihin, granulosisyytteihin ja monosyytteihin. (Savolainen ym. 2010, 87.)



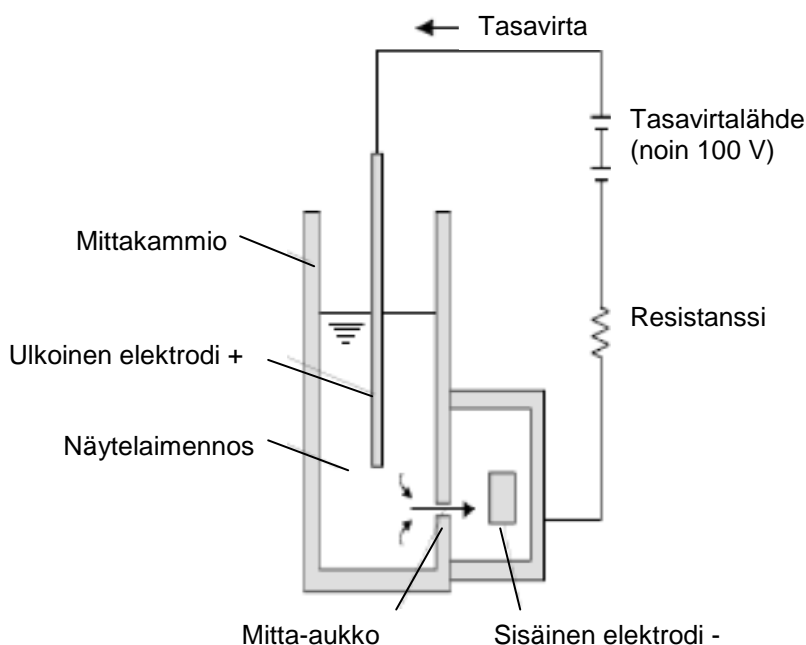
KUVIO 6. Esimerkki hydrodynaamisesta fokuoinnista (Kuusela 2011, 25)

Diffikanavalla punktionesteiden solujen erottelu perustuu fluoresenssiin, joka kertoo solun nukleiinihappopitoisuudesta ja sivulle sironneeseen valoon, joka kertoo solun sisäisestä rakenteesta (kuvio 7). Sysmex XE-5000 laimentaa vakiotilavuuden näytettä diffikanavalle automaattisesti suhteessa 1:51. Stromatolyser[®]-4DL -liuos hajottaa erytrosyytit ja trombositit. Stromatolyser[®]-4DS -polymetiiniväri läpäisee leukosyyttien solukalvon ja värjää nukleiinihapot ja soluorganellit tumassa ja sytoplasmassa. Mittaamalla nukleiinihappojen fluoresenssimäärää ja sivulle sironnutta valoa erotetaan solumuodot toisistaan. (Kuusela 2011, 36.) Tietojenkäsittelyjärjestelmän avulla tulokset voidaan muokata histogrammeiksi ja sirontakuvioiksi. Niiden avulla voidaan tarkastella näytteen solujakaumaa. (Savolainen ym. 2010, 90.)



KUVIO 7. Esimerkki Sysmex XE-5000 -analysaattorin virtauscytometrasta (Mukaillen Kuusela 2011, 27)

Punktionesteen erytrosyytit mitataan impedanssimittauksen avulla. Erytrosyytti/trombosyytti-kanavan eli RBC/PLT-kanavan mittausta perustuu radioaaltoihin ja tasavirtadetektioon (kuvio 8). Kun solu osuu mitta-aukko, on resistanssin muutos verrannollinen solun kokoon. Mitä isompi solu, sen suurempi resistanssi ja sitä enemmän solu sijoittuu erytrosyyttikuvaajassa oikealle. Muutos radioaallossa taas on verrannollinen solun sisäiseen rakenteeseen. Mitä monimutkaisempi solun sisäinen rakenne on, sen ylempänä se sijaitsee kuvaajalla, koska radioaallon kulku solun sisällä estyy enemmän. Jokaisen solun kokoon verrannollinen sähköinen pulssi mitataan ja mitta-alue jaetaan kanaviksi. Tämän jälkeen lasketaan kuinka paljon solupulsseja osuu kullekin kanavalle ja piirretään solumäärät histogrammeiksi. (Kuusela 2011, 69 - 70.)



KUVIO 8. Esimerkki tasavirtadetektion mittausperiaatteesta (Mukaillen Kuusela 2011, 75)

3.2.2 Käytettävät reagenssit

Sysmex XE-5000 -analysaattori käyttää mittauskanavillaan erilaisia reagensseja ja värejä (taulukko 2, sivu 27). Cellsheath[®]- ja Cellpack[®]-liuokset ympäröivät näytevirran ja niitä käytetään hydrodynaamisessa fokusoinnissa. Cellpack[®]-liuos on lisäksi näytelaimennin. Stromatolyser[®]-FB -liuos on voimakas pinta-

aktiivinen aine, jolla on korkea pH. Sitä käytetään WBC/Baso-kanavan reagenssina. Sen vaikutuksesta erytrosyytit ja trombositit hajoavat ja basofiilisiä granulocytejä lukuunottamatta leukocytetien sytoplasma kutistuu. Basofiiliset granulocyteit stabiloidaan niissä olevien granuloiden ominaisuuksien vuoksi. (Kuusela 2011, 17 - 18.)

Stromatolyser[®]-4DL -liuos on pinta-aktiivinen aine, joka hajottaa erytrosyytit ja trombositit sekä läpäisee leukocytetien pinnan. Stromatolyser[®]-4DS -liuoksen polymetiiniväri läpäisee solukalvon ja värjää nukleiinihapot tumassa ja sytoplasmassa. Reagensseja käytetään diffikanavan mittauksissa. Erythroblasti- eli NRBC-kanavalla taas Stromatolyser[®]-NR(L) -liuos hajottaa erytrosyytit ja trombositit ja Stromatolyser[®]-NR(S) -liuos värjää leukocyteit ja erythroblastien nukleiinihapot. RET Search[®] II Diluent -laimennusreagenssi käsittelee solukalvon väriainetta läpäiseväksi. RET Search[®] II Dye -polymetiiniväriaine menee solun sisään ja värjää nukleiinihappoja. Reagensseja käytetään RET-kanavalla, jossa erytrosyytit ja retikulosyytit erotetaan RNA-pitoisuuden perusteella sekä retikulosyytit ja leukocyteit erotetaan DNA-pitoisuuden erolla. Stromatolyser[®] IM -liuos on IMI-kanavan hajotus- eli lysointireagenssi. IMI-kanavalla havaitaan myeloisen solusarjan varhaismuotoja niiden sisäisen rakenteen ja nukleiinihappopitoisuuden mukaan. Sulfolyser[®] (SLS) -liuos on hemoglobiinimittauksen reagenssi. (Kuusela 2011, 17 - 18.)

TAULUKKO 2. Sysmex XE-5000 -analysointilaitteen käyttämät reagenssit
(Mukaan Kuusela 2001, 17 - 18)

Cellpack [®]	näytelaimennin, hydrodynaaminen fokusointi
Cellsheath [®]	hydrodynaaminen fokusointi
Stromatolyser [®] -FB	WBC/BASO -kanavan laimennusreagenssi
Stromatolyser [®] -4DL	Diffikanavan lysointireagenssi
Stromatolyser [®] -4DS	Diffikanavan väri
Stromatolyser [®] -NR(L)	NRBC -kanavan lysointireagenssi
Stromatolyser [®] -NR(S)	NRBC -kanavan väri
RET Search [®] II Diluent	RET -kanavan laimennusreagenssi
RET Search [®] II Dye	RET -kanavan väri
Stromatolyser [®] IM	IMI -kanavan lysointireagenssi
Sulfolyser [®] (SLS)	Hb-reagenssi

3.3 Laadunarviointi

Sisäinen laadunohjaus kuuluu osaksi jokaisen laboratoriomenetelmän suorittamista. Laboratorioiden tulee jatkuvasti tutkia omilla näytteillään tai kaupallisten tuotteiden avulla omien menetelmiensä tasoa. Hematologisissa analyyseissa tavoiterajat määritellään kullekin menetelmälle referenssilaboratorioiden tai laadunvalvontakierrokselle osallistuvien laboratorioiden arvojen avulla. Tavoiterajojen avulla pyritään siihen, että laboratorio pystyisi toistamaan analyysin joka kerta hyvän suorituskyvyn analyttisen kokonaisvirheen rajoissa. (Penttilä 2004, 36.)

Sysmex XE-5000 -analysaattorin verenkuvapuolen kontrolliliuos on e-check® (XE). Kontrolli ajetaan sekä manuaalipuolella että automaattisyötön kautta. Lisäksi käytetään päivittäin vaihtuvaa kontrollia, joka on viitearvojen sisällä oleva potilasnäyte. Se analysoidaan kolme kertaa päivässä manuaalipuolella ja tulosten pitää olla vaihteluvälien sisällä. Leukosyyttitulokset saavat vaihdella eri määrityskerroilla $0,5 \times 10^9/l$, erytrosyyttitulokset $0,2 \times 10^{12}/l$, hemoglobiini 4 g/l, hematokriitti 4 fl ja trombosyyttitulokset $30 \times 10^9/l$. Punktionesteiden analysoinnissa käytetään omia kontrolleja, matalaa ja korkeaa tasoa. Kontrolleina käytetään Cell-Chex™ Auto Body Fluid Cell Count Control –liuoksia. Tulosten pitää olla niille asetettujen vaihteluvälien sisällä. (Huollot Sysmex XE-5000, työohje 2011.)

Ulkoisella laadunarvioinnilla tarkoitetaan sellaisten näytteiden tai valmisteiden tutkimista, joiden arvoja määrittävä laboratorio ei tiedä. Vertaamalla omia tuloksia muiden laboratorioiden saamiin tuloksiin voidaan päätellä omien menetelmien taso kotimaisella ja kansainvälisellä tasolla. Ulkoista laadunarviointia Suomessa järjestää Labquality Oy. Labquality Oy järjestää lukuisia pitkäjäksoisia ja erilliskierroksia kaikille laboratorioaloille. Lisäksi osa suurimmista laboratorioista osallistuu kansainvälisiin laadunarviointikierroksiin. (Penttilä 2004, 35 - 38.) Seinäjoen keskussairaalan klinisen kemian yksikköön tulee hematologian laadunarviointinäytteitä Labquality Oy:ltä. Sysmex XE-5000 -analysaattorilla tehdään perusverenkuvan kahden tasoiset laadunarviointinäytteet kuusi kertaa vuodessa ja valkosolujen kaksitasoinen erittelylaskenta mikroskopoidaan kaksi kertaa vuodessa. Punktionesteistä laadunarviointinäytteitä ei toistaiseksi ole.

Sysmex XE-5000 -analysaattoria huolletaan päivittäin henkilökunnan toimesta. Päivittäin suoritettavia huoltotoimenpiteitä ovat *Shutdown*-ohjelman suorittaminen, jolloin laitteen mittausyksikkö ja näytelinjat puhdistetaan Cellclean -liuoksella. *Shutdown*-ohjelman jälkeen analysaattori täytyy käynnistää uudelleen. Lisäksi tarkistetaan ja tarvittaessa tyhjennetään Trap Chamber eli kompressorin nesteenkerääjä sekä puhdistetaan manuaalineulan huuhtelukuppi ja näytteenjakoventtiilin sekä automaattineulan tarjottimet. Viikko-, kuukausi- ja muut huollot suoritetaan vain tarvittaessa. (Roche Diagnostics Oy 2010; Huollot Sysmex XE-5000, työohje 2011).

4 AIKAISEMMAT TUTKIMUKSET

Suoniemi Siru ja Suoniemi Taru tekivät vuonna 2003 opinnäytetyön, jonka aiheena oli ”Kammiolaskennalla ja Advia™ 120 verenkuvaa-analysaattorin Cerebrospinal fluid (CSF)-ohjelmalla määritettyjen likvorin solujen ja erittelylaskennan tulosten vertailu”. Tutkimuksen tehtävänä oli tutkia miten Advia™ 120 verenkuvaa -analysaattorin CSF-ohjelman antamat tulokset leukosyyttien ja erytrosyyttien määrästä vastasivat kammiolaskennan tuloksia, lisäksi tutkimus käsitti erittelylaskennan tulosten vertailua. Tutkimuksen tavoitteena oli saada lisätietoa CSF -ohjelman luotettavuudesta ja tulosten perusteella Laboratoriokeskuksen hematologian laboratorio mietti mahdollisuuksia siirtyä CSF -ohjelman käyttöön selkäydinnesteen solujen laskennassa. Tutkimus suoritettiin Pirkanmaan sairaanhoitopiirin Laboratoriokeskuksen hematologian laboratoriossa. Tutkimuksessa oli mukana 55 selkäydinnesteenäytettä. Vertailun helpottamiseksi tulokset jaettiin ryhmiin kammiolaskennan solumäärien mukaan, runsassoluisia näytteitä vertailtiin näytekohtaisesti. Kammiolaskennan ja Advia™ 120 verenkuvaa-analysaattorin CSF -ohjelman tulosten välillä oli voimakas riippuvuus, mutta joukosta löytyi näytteitä, joiden kohdalla eri menetelmien tulokset erosivat toisistaan merkittävästi. Tutkimusten tulosten ja CSF -ohjelman käytössä havaittujen ominaisuuksien perusteella menetelmää ei otettu käyttöön Laboratoriokeskuksen hematologian laboratoriossa. (Suoniemi & Suoniemi 2003.)

Sanna Maltarin opinnäytetyön aiheena vuonna 2003 oli ”virtsan partikkelilaskija Sysmex UF-100:n soveltuvuus liquorin ja pleuranesteen solujen tutkimiseen”. Opinnäytetyö tehtiin Kanta-Hämeen keskussairaalan kliinisen kemian yksikköön. Tutkimuksessa haluttiin selvittää Sysmex UF-100:n soveltuvuus punktionesteiden solulaskentaan. Lisäksi selvitettiin miten Sysmex UF-100:n käyttö vaikutti selkäydin- ja pleuranesteiden solujen tutkimiseen käytettyyn aikaan. Tutkimuksessa punktionesteiden solut laskettiin ensin kammiolaskennalla ja sen jälkeen Sysmex UF-100:lla ja tuloksia verrattiin keskenään. Tutkimuksen otos oli 48 selkäydinneste- ja 28 pleuranestenäytettä. Tutkimuksen mukaan Sysmex UF-100 tunnistaa selkäydinnesteen ja pleuranesteen erytrosyytit hyvin kaikilla solumäärillä. Leukosyyttien tunnistus Sysmex UF-100:lta ei tutkimuk-

sessä onnistunut hyvin, joten analysaattoria ei voi käyttää leukosyyttien tutkimiseen punktionesteistä. (Maltari 2003.)

Clinical Biochemistry -lehdessä (2009, 42, 684 - 691) julkaistussa saksalaisessa tutkimuksessa vertailtiin Fuchs-Rosenthal -kammiolaskennan tuloksia ja Sysmex XE-5000 -analysaattorilla saatuja tuloksia. Vertailu koski leukosyyttien määrää 273 selkäydinnestenäytteessä. Erytrosyytilaskennan tuloksia taas vertailtiin Sysmex UF-100:n ja Sysmex XE-5000 -analysaattorin välillä. Leukosyyttien erittelylaskennan tuloksia vertailtiin Pappenheim -värjättyjen sivelyvalmisteiden ja Sysmex XE-5000 -analysaattorin tulosten välillä. Leukosyytilaskennan tuloksissa todettiin hyvä lineaarisuus välillä 1-10 000 solua/mm³ kammiolaskennalla ja Sysmex XE-5000 -analysaattorilla. Kammiolaskennan ja automaatin antamien tulosten välillä ei ollut tilastollisesti merkittäviä eroja ja suurin osa potilastuloksista saatiin luokiteltua oikein analysaattorin antamien tulosten perusteella, vaikka Sysmex XE-5000 -analysaattori antoi hieman korkeampia leukosyyttituloksia kuin kammiolaskenta, varsinkin matalilla solumäärillä. Tämän tutkimuksen mukaan Sysmex XE-5000 -analysaattori soveltuu leukosyyttien laskentaan selkäydinnestenäytteistä. Erytrosyyttien kohdalla tulokset olivat lineaarisia 1-1000 x 10³ erytrosyyttiä/mm³ Sysmex UF-100:n ja Sysmex XE-5000 -analysaattorin välillä. Näiden analysaattorien antamien tulosten välillä oli kuitenkin havaittavissa huomattavia tuloseroja joidenkin näytteiden kohdalla. (Boer, Deufel & Reinhoefer 2009, 684 - 691.)

Clinical Chemistry and Laboratory Medicine -lehdessä (2010, 48, 665 - 675) julkaistiin hollantilainen tutkimus, jonka tarkoituksena oli arvioida Sysmex XE-5000 -analysaattorin punktionestehjelmaa. Tutkimuksessa verrattiin 226 punktionestenäytteestä Fuchs-Rosenthal -kammiolaskennan tuloksia Sysmex XE-5000 -analysaattorilla saatuihin tuloksiin. Lisäksi erittelylaskennan tuloksia verrattiin analysaattorin ja sytosentrifugipreparaattien välillä. Tutkimuksessa automaattilla saadut tulokset olivat hyvin vertailukelpoisia ja lineaarisia kammiolaskennan tulosten kanssa ja carry over-siirtymä näytteestä toiseen oli hyvin matala (< 0,17 %). Selkäydinnestenäytteiden kohdalla havaittiin, että Sysmex XE-5000 -analysaattori antaa korkeampia leukosyyttituloksia kuin kammiolaskenta, varsinkin vähäisillä solumäärillä. Tutkimuksen tuloksen mukaan Sysmex XE-5000 -analysaattori antaa nopean ja tarkan vaihtoehdon kammiolaskennalle

selkäydinneste- ja muiden punktionestenäytteiden tutkimisessa. (de Jonge ym. 2010, 665 - 675.)

5 TUTKIMUKSEN TARKOITUS, TAVOITE JA TEHTÄVÄT

Ennen uuden tutkimusmenetelmän käyttöönottoa kliinisessä laboratoriossa menetelmän tulostasoa ja luotettavuutta täytyy verrata käytössä olevaan menetelmään. Tällöin käytäntönä on tehdä saman näytteen määrittäminen käytössä olevalla ja uudella menetelmällä. Tähän vertailuun tulisi saada riittävä määrä eritasoisia näytteitä, jotta saadaan selville, antaako uusi menetelmä luotettavia tuloksia näytteen laadusta riippumatta. Tulostason täytyy pysyä samana tutkimuksen tekijästä ja menetelmästä riippumatta.

Seinäjoen keskussairaalan klinisen kemian yksikköön hankittiin uudet Sysmex XE-5000 -analysaattorit loppuvuodesta 2010 verenkuvatutkimuksia varten. Laitteilla on mahdollista tutkia myös punktionesteitä. Tällä hetkellä punktionesteiden solututkimukset tehdään laskentakammiossa. Opinnäytetyön tarkoitus on vertailla selkäydinneste- ja nivelnestenäytteistä tehtävien, kammiossa laskettavien solututkimusten tuloksia Sysmex XE-5000 -analysaattorilla saatuihin tuloksiin. Tavoitteena on tuottaa tietoa klinisen kemian yksikön henkilökunnalle, jotta he voivat selvittää, onko mahdollista siirtyä punktionesteiden tutkimisessa Sysmex XE-5000 -analysaattorin käyttöön. Omina tavoitteina meillä oli syventää tietämystämme punktionesteistä ja niiden tutkimuksista sekä perehtyä menetelmävertailun tekemiseen.

Opinnäytetyössämme pyrimme selvittämään vastaukset seuraaviin kysymyksiin:

1. Ovatko selkäydinneste- ja nivelnestenäytteet tutkittavissa Sysmex XE-5000 -analysaattorilla?
2. Kuinka näytteiden erilaiset solumäärät ja koostumus vaikuttavat näytteiden tutkittavuuteen kammiolaskennassa ja Sysmex XE-5000 -analysaattorilla?
3. Mitkä ovat Sysmex XE-5000 -analysaattorin mittausperiaatteet punktionestetutkimuksissa?

6 TUTKIMUSMENETELMÄ JA AINEISTON ANALYSOINTIMENETELMÄT

6.1 Tutkimusmenetelmä

Ennen tutkimusmenetelmän valintaa pitää selvittää mitä tutkitaan, minkälaista aineistoa kerätään ja mitä lähestymistapaa tutkimuksessa käytetään. Tutkimusmenetelmän valintaan liittyy kysymys, millaista tietoa tutkimuksella tavoitellaan ja millä menetelmillä haluttua tietoa saadaan. Pitää myös miettiä minkälaista aineistoa halutaan kerätä. (Hirsjärvi, Remes & Sajavaara 2007, 120.)

Määrällisessä tutkimusprosessissa teorian merkitys näkyy siinä, että tutkimuksessa edetään ensin teoriasta käytäntöön eli havainnointiin. Tämän jälkeen palataan takaisin käytännöstä teoriaan analyysin, tulosten ja tulkinnan avulla. (Vilkkä 2007, 25 - 26.) Ensin perehdymme aiheeseemme liittyvään teoriaan, jonka pohjalta laadimme havainnointilomakkeen. Havainnointilomakkeella saatuja tuloksia analysoimme tilastollisin menetelmin. Tuloksia pyrimme tulkitsemaan teoriapohjan avulla ja tekemään niistä johtopäätöksiä.

Opinnäytetyömme on kokeellinen ja vertaileva tutkimus. Vertailussa on tavoitteena ymmärtää paremmin tarkasteltavaa asiaa kahden tai useamman tutkimuskohteen avulla sekä tuoda selkeämmin esille asioiden välisiä eroja (Vilkkä 2007, 21). Työssämme vertaamme Sysmex XE-5000 -analysointilaitteen punktionesteistä antamia tuloksia nykyisin käytössä olevan kammiolaskennan tuloksiin.

Kokeellinen tutkimus on systemaattista ja kontrolloitua havaintojen tekoa. Tapahtumien kulku raportoidaan sellaisella tarkkuudella, että sen toistaminen yhä uudelleen on mahdollista. Tutkimustulosta häiritsevät tekijät pyritään kontrolloimaan tai poistamaan. (Anttila 2006, 270 - 271.) Kokeellisessa osuudessa selkäydinneste- tai nivelnestenäyte tutkitaan kahdella eri menetelmällä. Haluamme selvittää, onko näytteen solumäärällä ja viskositeetilla merkitystä tutkimusmenetelmän valintaan. Näytteet analysoidaan Etelä-Pohjanmaan sairaanhoitopiirin työohjeiden mukaisesti. Ohjeita noudattamalla saamamme tulokset ovat vertailukelpoisia ja tutkimuksemme voidaan toistaa.

Mittari on väline, jonka avulla saadaan määrällinen tieto tai määrälliseen muotoon muutettava sanallinen tieto tutkittavasta asiasta. Mittarina voi olla esimerkiksi havainnointilomake. (Vilkkä 2007, 14 - 15.) Havainnointilomakkeen avulla laboratoriohenkilökunta kirjaa näytteen ulkonäön ja kammiolaskennan tulokset sekä tulostaa Sysmex XE-5000 -analysaattorilta tulosteen myöhempää analysointia varten. Analysoimattomat näytteet kirjataan omalle lomakkeelle.

Tutkimus voi olla kokonais- tai otantatutkimus, jolloin vain tietty perusjoukon osajoukko eli otos tutkitaan. Otos eli havaintoyksiköiden joukko on edustava kuva perusjoukosta. Otos valitaan jollakin otantamenetelmällä. Yksinkertainen satunnaisotanta on perusmenetelmä, jossa havaintoyksiköt valitaan perusjoukosta sattumanvaraisesti. (Heikkilä 2008, 33; Vilkkä 2007, 51 - 53.) Otoksen tulee olla sitä isompi, mitä yksityiskohtaisempaa tietoa halutaan saada. Mitä suurempi otos on poimittu, sitä varmemmin otoksesta saadut tulokset pätevät myös koko perusjoukkoon. Näin mittaustulosten perusteella voidaan tehdä johtopäätöksiä, vaikka erot mitattavassa ominaisuudessa ryhmien välillä olisivat pieniäkin. (Heikkilä 2008, 42; Valli 2001, 14.) Vertailtavat punktionestenäytteet valitaan satunnaisotannalla. Potilaiden iällä, tutkimuspyynnön syyllä tai muilla vastaavilla tekijöillä ei ole merkitystä näytteiden valinnassa. Työhömmme pyrimme saamaan mahdollisimman kattavan otoksen. Näytteitä vertailua varten on tarkoitus kerätä noin kahden kuukauden ajan. Tavoitteenamme on saada vertailua varten 50 selkäydinneste- ja 50 nivelnestenäytettä mahdollisimman luotettavien ja yleistettävissä olevien johtopäätösten tekemiseksi.

6.2 Tilastolliset analysointimenetelmät

Tietoa kootaan tutkimustyön pohjaksi. Kun tieto on kerätty, se luokitellaan ja sen jälkeen luokittelua hyväksikäyttäen esitetään taulukkoina ja kuvioina. Tilastolliset tunnusluvut kuvaavat, millainen aineisto on pääpiirteissään. (Ernvall, Ernvall & Kaukkila 2002, 19.) Keräämämme aineiston analysoimme Excel- ja Tixel-tilastokalkulaattorien avulla. Aineiston analysoinnin apuna käytämme korrelaatio-, regressio- ja keskiarvoanalyysia.

Korrelaatiolla tarkoitetaan kahden tilastomuuttujan keskinäistä riippuvuutta (Ernvall ym. 2002, 69). Korrelaatiota voidaan tulkita graafisesti merkitsemällä tilastoyksiköiden muuttuja-arvoja vastaavat pisteet koordinaatistoon, jolloin syntyy sirontakuvio. Sirontakuvion avulla voidaan tulkita, onko muuttujilla positiivinen tai negatiivinen lineaarinen korrelaatio, ei korrelaatiota tai ei-lineaarinen korrelaatio. (Ernvall ym. 2002, 71.) Saaduista tuloksista on tarkoitus tehdä Excel-taulukkolaskentaohjelman avulla sirontakuvioita, joiden avulla tarkastelemme eri arvoparien välistä riippuvuutta.

Korrelaatiota voidaan ilmaista paitsi graafisesti myös korrelaatiokerroimen avulla. Korrelaatiokerroin on riippuvuuden tunnusluku. (Ernvall ym. 2002, 77.) Korrelaatiokerroin vaihtelee $-1:n$ ja $1:n$ välillä ja kertoimen arvo 0 ilmoittaa, ettei lineaarista riippuvuutta ole. Kerroin kuvaa, kuinka hyvin muuttujien arvopareja kuvaavat pisteet sijoittuvat samalle suoralle. Jos kerroin on lähellä arvoa 1, muuttujien välillä on voimakas positiivinen korrelaatio eli toisen muuttujan kasvaessa toinenkin kasvaa. Jos kerroin on lähellä arvoa -1 , muuttujien välillä on voimakas negatiivinen korrelaatio, toisen muuttujan kasvaessa toisen muuttujan arvo pienenee. (Heikkilä 2008, 90 - 91.) Käytännössä korrelaatiokerroin lasketaan aina tilasto-ohjelmalla. Isommasta otoksesta saatu tulos on paremmin yleistettävissä. (Ernvall ym. 2002, 78.) Haluamme tarkastella, onko kammiolaskennan ja Sysmex XE-5000 -analysaattorin antamien tulosten välillä havaittavissa lineaarista riippuvuutta.

Jos kahden muuttujan välinen riippuvuus on lineaarista, niin havaintopisteet keskittyvät tietyn suoran ympärille. Suoraa, jonka ympärille keskittyminen on täydellisintä, nimitetään regressiosuoraksi. Yleensä regressiosuora piirretään samaan kuvaajaan hajontakuvion kanssa. Regressiosuoraa muodostettaessa pyritään löytämään sääntö, jonka mukaan muuttujan y arvot riippuvat muuttujan x arvoista. Suoran määrittäminen tapahtuu niin sanotun pienimmän neliösumman menetelmällä, jossa minimoidaan pisteiden pystysuorat etäisyydet suorasta. (Ernvall ym. 2002, 73; Karjalainen 2004, 116.) Tarkoitus on selvittää, kuinka saamamme tulokset keskittyvät regressiosuoran ympärille.

Keskiarvo saadaan jakamalla muuttujan arvojen summa niiden lukumäärällä n . Keskiarvo kuvaa muuttujien jakaumaa. (Karjalainen 2004, 70 - 71.) Keskiarvotesteillä vertaillaan ryhmien keskiarvoja toisiinsa. Keskiarvojen välisiä eroja voidaan analysoida. Analysointia käytetään paljon kokeellisissa tutkimuksissa, jolloin selvitetään, kuinka suuri osa vaihtelusta on eri koemuuttujien aiheuttamaa. (Heikkilä 2008, 224). Laskemme keskiarvot analysoitujen näytteiden solumäärästä ja vertaamme niitä sameuden ja värin numeerisiin arvoihin. Haluamme tarkastella, onko näytteen solumäärällä yhteys näytteen väriin ja sameuteen.

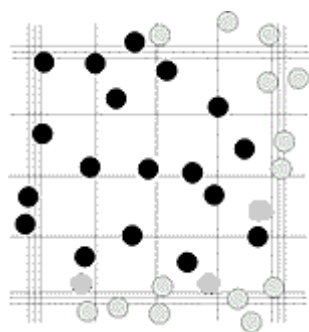
7 OPINNÄYTETYÖN PROSESSI

Opinnäytetyön aiheen saimme syyskuussa 2010, jonka pohjalta laadimme ideapaperin ja etsimme kirjallisuutta aiheeseemme liittyen. Aiheemme muuttui nykyiseksi marraskuussa 2010 palaverissa aiheen ehdottajan Seinäjoen keskussairaalan kliinisen kemian yksikön ylikemisti Kari Åkermanin kanssa. Tämän jälkeen kirjoitimme uuden ideapaperin opinnäytetyön tekemisen tueksi. Suunnitelman kirjoittamisen aloitimme välittömästi ideapaperin tekemisen jälkeen. Suunnitelman liitteeksi teimme aineiston keruuta varten havainnointilomakkeet nivel- ja selkäydinnesteelle. Lomakkeet olivat laboratorion henkilökunnan kommentoitavina eritelaboratoriossa muutaman päivän ajan. Heidän havaintojensa pohjalta muokkasimme lomakkeita paremmin tarkoitukseen sopiviksi. Lupahakemus ja suunnitelma hyväksytettiin ohjaavilla opettajilla helmikuun 2011 alussa. Allekirjoitetut lupahakemukset toimitimme hyväksyttäväksi ylikemisti Kari Åkermanille ja kliinisen kemian ja hematologian ylilääkärille Onni Niemelälle 15.2.2011, jotka myönsivät luvan opinnäytetyön tekemiselle maaliskuun 2011 alussa. Opinnäytetyömme aiheen esittelimme Seinäjoen keskussairaalan kliinisen kemian laboratorion viikkopalaverissa 23.2.2011.

Sysmex XE-5000 -analysaattorit asennettiin Seinäjoen keskussairaalan kliinisen kemian yksikköön joulukuussa 2010 ja laitteet otettiin käyttöön verenkuvatutkimuksiin 12.3.2011 henkilökunnan perehdytyksen jälkeen. Kävimme tutustumassa Sysmex XE-5000 -analysaattorin toimintaan huhtikuun 2011 alussa. Henkilökunta aloitti punktionestenäytteiden keräyksen vertailua varteni heti laitteen käyttöönoton jälkeen. Kirjoitimme raporttiosaa suunnitelman tekemisen ohella ja jatkoimme sitä koko kevään 2011 ajan. Ohjaavien opettajien kanssa käytyjen keskusteluiden pohjalta muokkasimme teoriasisältöä ja saimme neuvoja kuinka edetä kirjoittamisessa. Sähköpostikeskusteluista laboratorion yhteishenkilömme kanssa saimme tietoa käytännön työtavoista Seinäjoen keskussairaalan kliinisen kemian yksikössä. Teoriaosuuden saimme viimeistelyä vaille valmiiksi toukokuussa 2011. Aineiston keräys kesti 8.8.2011 saakka, jonka jälkeen aloitimme sen analysoinnin.

7.1 Kokeellinen osuus

Näytteiden analysoinnin tekee Seinäjoen keskussairaalan klinisen kemian laboratorion henkilökunta laboratorioon saapuvista potilasnäytteistä. He laskevat solut laskentakammiossa ja analysoivat näytteet Sysmex XE-5000 -analysaattorilla vertailua varten. Näytteiden analysointi tehdään työohjeiden mukaisesti ja työturvallisuutta noudattaen. Selkäydinneste- tai nivelnestenäytteen saapuessa laboratorioon, tarkistetaan että tutkimuspyynnöt ovat asianmukaisia. Tämän jälkeen tarkistetaan silmämääräisesti näytteen ulkonäkö ja määrä. Selkäydinnestenäytteistä väri ja sameus arvioidaan ennen ja jälkeen sentrifugoinnin. Nivelnestenäytteiden väri ja sameus arvioidaan vain ennen sentrifugointia. Kemiallisia tutkimuksia varten näytteitä sentrifugoidaan ja jaetaan tarvittaessa analysaattorikohtaisiin näyteputkiin. Putki, josta on pyydetty Solututkimus, laitetaan pyörimään sekoittajaan. Huolellisen sekoituksen jälkeen näytettä pipetoidaan laskentakammioon. Solujen annetaan laskeutua kammion pohjalle noin kymmenen minuutin ajan kostutetun imupaperin päällä petrimaljan pohjalla. Solut lasketaan laskentasääntöjen mukaan (kuvio 9). Lopullisessa vastauksessa tulee huomioida mahdollinen laimennos ja mitä ruutuja on laskettu, jotta vastattu tilavuus on oikea.



KUVIO 9. A-ruudusta laskettavat solut (Mukaillen Lo-laboroptik)

Vertailua varten henkilökunta kirjaa tulokset havainnointilomakkeelle (liite 1). Havainnointilomakkeessa on kohdat näytteen värin ja sameuden arviointiin sekä erytrosyyttien ja leukosyyttien määrän kirjaamiseen. Värin arviointi tehdään ympyröimällä lomakkeesta parhaiten näytettä kuvaava vaihtoehto. Sameus arvioidaan ympyröimällä näytettä parhaiten kuvaava numero, numeron nolla ol-

lessa kirkas ja numeron kolme ollessa hyvin samea. Lomakkeeseen kirjataan myös näytteen mahdollinen laimennos ja muut huomioitavat asiat.

Kammiolaskennan perusteella vastaukset ilmoitetaan Effica -tietojärjestelmään, ja jos tämän jälkeen näytettä on jäljellä riittävästi, vähintään 500 µl, tutkitaan sama näyte myös Sysmex XE-5000 -analysaattorilla. Näytteen silmämääräisen arvioinnin perusteella tehdään päätös siitä, voidaanko näytettä analysoida Sysmex XE-5000 -analysaattorilla. Viskositeetiltaan korkeita nivelnestenäytteitä ei tutkita Sysmex XE-5000 -analysaattorilla sen tukkeutumisvaaran vuoksi.

Punktionestehjelma valitaan Sysmex XE-5000 -analysaattorin näytöltä nuolinäppäimillä. Valinnan jälkeen laite suorittaa automaattisesti toiminnon *Background Check* eli taustan tarkistuksen. Ennen kuin taustan tarkistus on hyväksytty mennyt läpi, näytteitä ei saa analysoida. Jos taustan tarkistus ei mene läpi, voidaan suorittaa *Auto Rinse* -toiminto, joka huuhtelee laitteen letkuston. Huuhtelun jälkeen taustan tarkistus voidaan suorittaa uudelleen.

Vertailun ajan punktionesteiden kontrollit määritetään niinä päivinä kun näytteitä analysoidaan. Kontrolleina käytetään Cell-Check Auto Body Fluid Cell Count Control -liuoksia. Kontrollien tuloksia verrataan valmistajan ilmoittamiin rajoihin ja tuloksien pitää olla vaihteluvälin sisällä, jotta ne voidaan hyväksyä. Tarvittaessa kontrollit voidaan analysoida uudelleen. Kontrollitulokset tulostetaan taulukointia varten (liite 2).

Punktionestenäytteet analysoidaan analysaattorin manuaalipuolella. Selkäydinnestenäyte joudutaan siirtämään alkuperäisestä näyteputkesta matalampaan putkeen analysointia varten. Näyte sekoitetaan huolellisesti kääntelemällä juuri ennen analysointia ja näyteputki asetetaan näyteneulan alle siten, että neulan kärki on nestepinnan alapuolella. Käynnistyspainiketta painamalla Sysmex XE-5000 -analysaattori imee näytettä. Näyteputki täytyy pitää paikallaan niin kauan kuin *Ready*-valo vilkkuu. Kun *Ready*-valo sammuu ja analysaattori antaa kaksi lyhyttä äänimerkkiä, saa näyteputken poistaa. Putki pitää poistaa suoraan alaspäin, jotta näyteneula ei väännä. Putken poiston jälkeen laite suorittaa näyteneulan huuhtelun.

Sysmex XE-5000 -analysaattorin näytöllä lukee Ready, kun näytteen tulokset ovat valmiina. Tulokset siirtyvät tarkasteltavaksi analysaattoriin liitetyille näyttöpäätteille, joissa tulokset näkyvät numeerisesti ja sirontakuviona (liite 3). Tulosten tarkastelussa tulee huomioida, että Sysmex XE-5000 -analysaattori ilmoittaa erytrosyyttituloksen $10^6/\mu\text{l}$, kun taas kammiolaskennan tulos on muotoa $10^6/\text{l}$. Sysmex XE-5000 -analysaattorin antama erytrosyyttitulos pitää kertoa 1 000 000, esimerkiksi $0.002 \times 10^6/\mu\text{l}$ on $2000 \times 10^6/\text{l}$.

$$(Y \times 10^6/\mu\text{l}) \times 1000\ 000 = Y \times 10^6/\text{l}$$

Leukosyyttivastaus on muotoa $10^6/\text{l}$, joka on suoraan verrattavissa kammiolaskennan tuloksiin. Vastauksista tulostetaan raportti, joka liitetään yhteen näytteen kammiolaskennan tulosten kanssa. Jos analysoidussa näytteessä on ollut paljon soluja, Sysmex XE-5000 -analysaattori saattaa pyytää suorittamaan taustan tarkistuksen ennen seuraavan näytteen analysointia. Taustan tarkistuksella vähennetään carry over -virheen mahdollisuutta. Punktionesteen analysoinnin jälkeen pitää muistaa palata verenkuvahjelmaan.

7.2 Aineiston käsittely

Aineiston keräys suoritettiin 12.3. - 8.8.2011 välisenä aikana. Näytteitä, joista Sysmex XE-5000 -analysaattorin tulokset puuttuvat, ei otettu mukaan vertailuun. Vertailussa mukana olevat nivel- ja selkäydinnestenäytteet numeroimme juoksevilla numeroilla 1 - 18. Tulokset syötimme Excel-taulukkolaskentaohjelmaan. Taulukkoon kirjasimme jokaisen näytteen kohdalta leukosyytti- ja erytrosyyttimäärät kammiolaskennan ja Sysmex XE-5000 -analysaattorin osalta (liite 4). Annoimme jokaiselle värivaihtoehdolle numeerisen arvon, jonka syötimme taulukkoon. Myös sameuden arvioinnin ja mahdolliset lisähuomiot kirjasimme Excel-taulukkoon. Teimme nivel- ja selkäydinnestenäytteille omat taulukot ja lisäksi kirjasimme erilliseen taulukkoon Sysmex XE-5000 -analysaattorilla analysoimattomat näytteet (liite 5). Kontrollituloksista laadimme taulukon, josta käy ilmi kontroleista saadut tulokset ja niiden tavoitearvot (liite 2).

Excel-taulukoiden pohjalta laskimme kammiolaskennan ja Sysmex XE-5000 -analysointilaitteen antamien tulosten väliset korrelaatiot leukosyyteille ja erytrosyyteille sekä nivelneste- että selkäydinnesteenäytteistä. Teimme luvuista myös siirontakuviot ja tarkastelimme, kuinka luvut asettuvat regressiosuoralle. Vertasimme Tixel-tilastointilaskentaohjelman avulla näytteiden leukosyyttimäärien keskiarvoja näytteiden sameusasteeseen ja erytrosyyttimäärien keskiarvoja väriin.

8 VERTAILUN TULOKSET JA JOHTOPÄÄTÖKSET

Aineistoa saimme yhteensä 49 kappaletta, joista nivelnesteitä 26 ja selkäydinnesteitä 23 kappaletta. Vertailuun otettiin mukaan 18 selkäydinneste- ja 18 nivelnesteinäytettä. Lopuista näytteistä ei saatu tulosta Sysmex XE-5000 -analysaattorilla. Kolme selkäydin- ja kaksi nivelnesteinäytettä olivat näytemäärältään niukkoja, joten niistä ei riittänyt materiaalia vertailuajoon. Kahta selkäydinnesteinäytettä ei analysoitu, koska Sysmex XE-5000 -analysaattorit olivat varattuna maakunnista saapuneiden verinäytteiden analysointiin. Neljän nivelnesteinäytteen viskositeetti oli korkea ja ne olivat sakkaisia, joten niitä ei analysoitu Sysmex XE-5000 -analysaattorilla tukkeutumisvaaran vuoksi. Yhden nivelnesteinäytteen viskositeetti oli niin korkea, ettei sitä voinut pipetoida ja lisäksi mikroskoopissa havaittiin, että solut olivat kasoilla. Näytettä ei analysoitu Sysmex XE-5000 -analysaattorilla. Yhtä nivelnesteinäytettä emme ottaneet mukaan vertailuun, koska näyteputki oli sentrifugoitu ennen vertailuajoa ja näytteeseen oli muodostunut sakkaa, joka ei enää liuennut sekoittamalla.

Nivelnesteinäytteet 5, 7, 8, 15 ja 16 oli laimennettu kammiolaskentaa varten, selkäydinnesteinäytteistä yhtäkään ei laimennettu (liite 4). Sysmex XE-5000 -analysaattoria varten näytteille ei tehty manuaalilaimennusta. Nivelnesteinäytteistä 2, 3, 7, 8 ja 10 Sysmex XE-5000 -analysaattori antoi @ -liputuksen, joka tarkoittaa, että tulos on yli lineaarisuuden. Tällöin näytteessä on paljon soluja ja se olisi hyvä laimentaa tuloksen luotettavuuden varmistamiseksi. Kyseiset näytteet ovat mukana vertailussa. Selkäydinnesteinäytteestä numero 4 löytyi kammiolaskennassa hajonneita leukosyyttejä noin $600 \times 10^6/l$ ehjien, laskennassa huomioitujen leukosyyttien lisäksi. Selkäydinnesteinäytteet 14, 15 ja 16 ovat samasta potilaasta eri putkiin otettuja näytteitä, joista kaikista on tehty solulaskenta artefaktavuodon poissulkemiseksi. Näyte 14 on näyteputkesta numero 5, näyte 15 putkesta numero 4 ja näyte 16 putkesta numero 3.

Vertasimme leukosyyttimäärien keskiarvoja näytteiden sameuteen (liite 6). Näytteiden sameus arvioitiin asteikolla 0 - 3, nollan ollessa kirkas ja kolmen ollessa hyvin samea. Selkäydinnesteinäytteistä 13 kappaletta arvioitiin kirkkaaksi ennen ja jälkeen sentrifugoinnin ja sentrifugoinnin jälkeen sameatkin selkäydin-

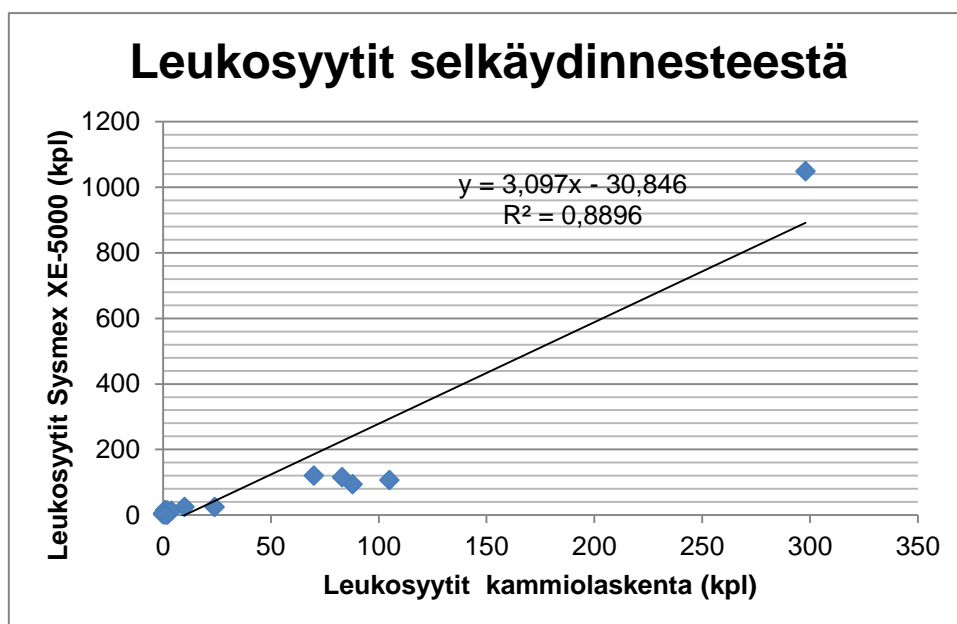
nestenäytteet arvioitiin kirkkaiksi. Nivelnestenäytteistä 13 kappaletta arvioitiin kirkkaiksi. Kirkkaiksi arvioiduissa näytteissä oli myös keskimäärin vähiten leukosyyttejä. Nivelnestenäytteiden kohdalla myös muut sameusasteet antoivat viitteitä näytteiden leukosyyttimääristä eli hyvin sameaksi arvioidussa näytteessä oli myös keskimäärin enemmän leukosyyttejä kuin hiukan sameassa. Selkäydinnesteissä leukosyyttimäärät eivät liittyneet suoraan arvioituun sameusasteeseen.

Näytteiden silmämääräisen arvioinnin perusteella voidaan tehdä oletuksia näytteiden leukosyyttimääristä. Sameuden arviointi on kuitenkin subjektiivista, joten eri työntekijät voivat arvioida sameutta eri tavoin. Silmämääräisen sameuden arvioinnin perusteella tehdään päätös, pitäisikö näyte laimentaa Sysmex XE-5000 -analysaattoria varten. Leukosyyttimäärien pitää pysyä analysaattorin mittausrajojen sisällä, jotta lineaarisuusrajat eivät ylittyisi ja tulokset olisivat luotettavia. Sameutta näytteisiin voi leukosyyttien lisäksi aiheuttaa myös esimerkiksi bakteeritulehdus, synoviosyyttien jäänteet ja fibriini.

Vertasimme erytrosyyttimäärien keskiarvoja näytteiden väriin (liite 6). Väriä arvioitiin Seinäjoen keskussairaalan kliinisen kemian yksikön työohjeiden mukaan. Väri vaihtoehdot olivat väritön, keltainen, kellertävä, punertava, punainen ja ruskea. Taulukointia varten annoimme väreille numeeriset arvot 1-6. Selkäydinnestenäytteet ovat normaalisti värittömiä ja nivelnestenäytteet kellertäviä ja näytteiden väri voi antaa viitteitä mahdollisesta taudinaiheuttajasta tai vuodosta. Nivelnesteen keltainen väri yleensä syvenee, kun on kyse tulehduksesta, ja selkäydinneste muuttuu kellertäväksi, kun näytteessä on bilirubiinia. Selkäydinnestenäytteistä 14 kappaletta oli kirkkaita. Sysmex XE-5000 -analysaattorin saamien tulosten mukaan kirkkaissa näytteissä ei ollut myöskään erytrosyyttejä, mutta kammiolaskennassa niitä oli löydetty keskimäärin 49 kappaletta. Yksi selkäydinneste oli arvioitu keltaiseksi ennen sentrifugointia, erytrosyyttejä siinä oli kammiolaskennan perusteella 3 kappaletta ja Sysmex XE-5000 -analysaattori antoi tulokseksi nolla.

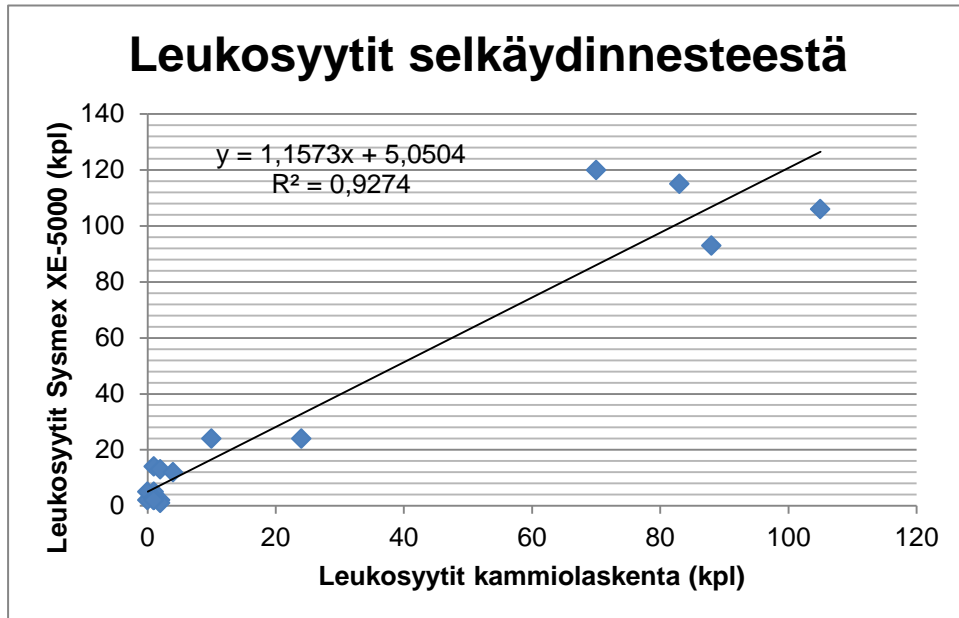
Nivelnestenäytteistä 12 kappaletta arvioitiin keltaisiksi. Keltaisiksi arvioiduissa näytteissä oli keskimäärin enemmän erytrosyyttejä kuin kellertävissä ja punaisiksi arvioiduissa erytrosyyttejä oli eniten. Nivelnestenäytteiden kohdalla arvioitu

väri antaa viitteitä näytteen erytrosyyttimäärästä. Selkäydinnesteiden kohdalla vain kolmessa näytteessä oli runsaasti erytrosyyttejä ja ne arvioitiin ennen sentrifugointia väriltään punaisiksi. Sentrifugoinnin jälkeen ne arvioitiin keltaisiksi. Kaikissa muissa selkäydinnestenäytteissä oli kammiolaskennan perusteella vain vähän erytrosyyttejä ja Sysmex XE-5000 -analysaattorin antamien tulosten perusteella ei yhtään. Solumäärien keskiarvojen ja otoskoon perusteella ei voi tehdä yleistettävissä olevia johtopäätöksiä solumäärien yhteydestä näytteiden sameuteen ja väriin.



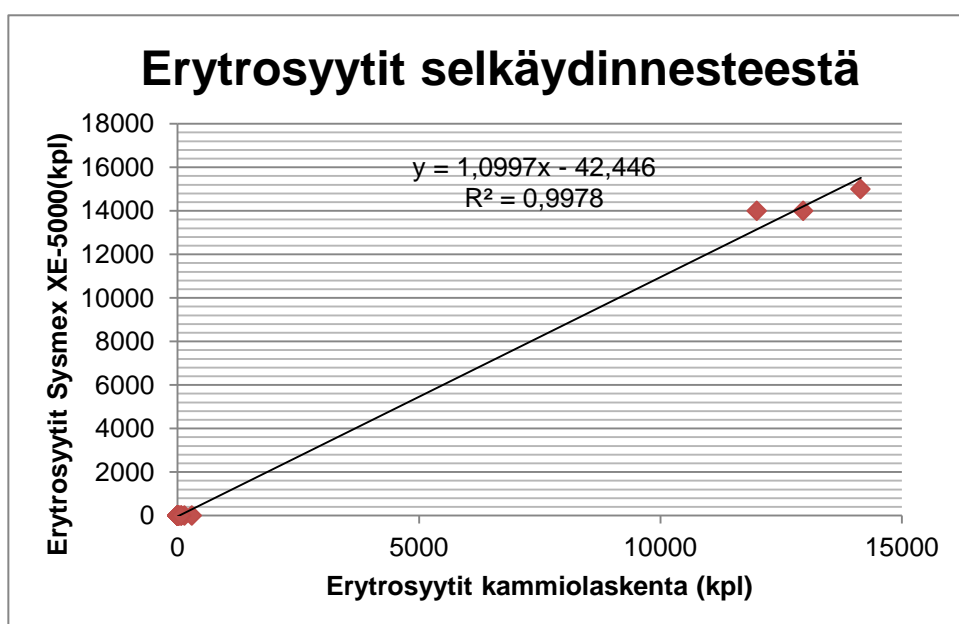
KUVIO 10. Regressiosuora selkäydinnesteen leukosyytteistä (n=18)

Yksi muista selkäydinnestenäytteistä poikkeava tulos, näyte 4, vaikuttaa merkittävästi kulmakertoimeen ja korrelaatioon sekä vääristää regressiosuoraa (kuvio 10). Koska otoksessa on vain yksi näyte, jossa on paljon leukosyyttejä, sen perusteella ei voi tehdä johtopäätöksiä menetelmien vertailtavuudesta korkeiden solumäärien osalta, koska emme tiedä mihin muut solumäärältään korkeat tulokset sijoittuisivat kuviossa. Kammiolaskennan ja Sysmex XE-5000 -analysaattorin antamien tulosten välinen korrelaatio leukosyyteille selkäydinnesteestä on 0,943. Näytteessä 4 havaittiin kammiolaskennan yhteydessä hajonneita leukosyyttejä noin $600 \times 10^6/l$ ehjien leukosyyttien lisäksi. Sysmex XE-5000 -analysaattori on luultavasti laskenut myös hajonneita leukosyyttejä mukaan tulokseen, mikä selittää eri menetelmien välisen tuloseron.



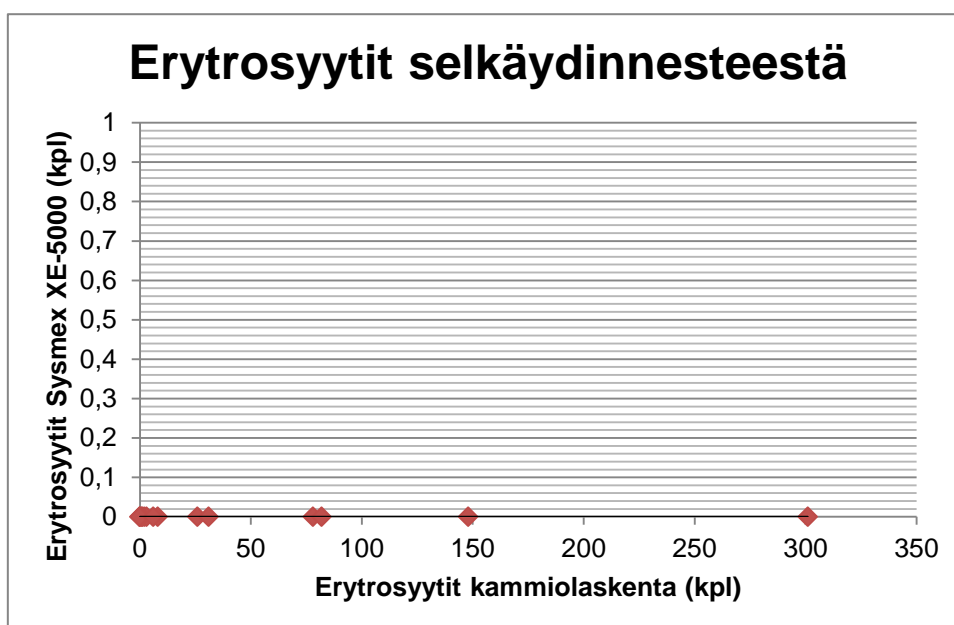
KUVIO 11. Regressiosuora selkäydinnesteen leukosyyteistä ilman näytettä 4 (n=17)

Teimme regressiosuoran myös ilman näytettä numero 4 (kuvio 11), jotta saimme vertailtua solumäärältään matalampia tuloksia ilman kyseisen näytteen aiheuttamaa vääristymää. Ilman näytettä 4 regressiosuoran kulmakerroin laskee ja regressiosuora asettuu paremmin havaintopisteiden keskelle. Ilman näytettä numero 4 menetelmien antamien tulosten välinen korrelaatio on 0,963. Matalat solumäärät antavat paremman korrelaation kuin koko otoksesta saatu korrelaatio. Saadut korrelaatiot antavat viitteitä lineaarisuudesta, mutta tällä otoskoolla ne eivät ole luotettavia.



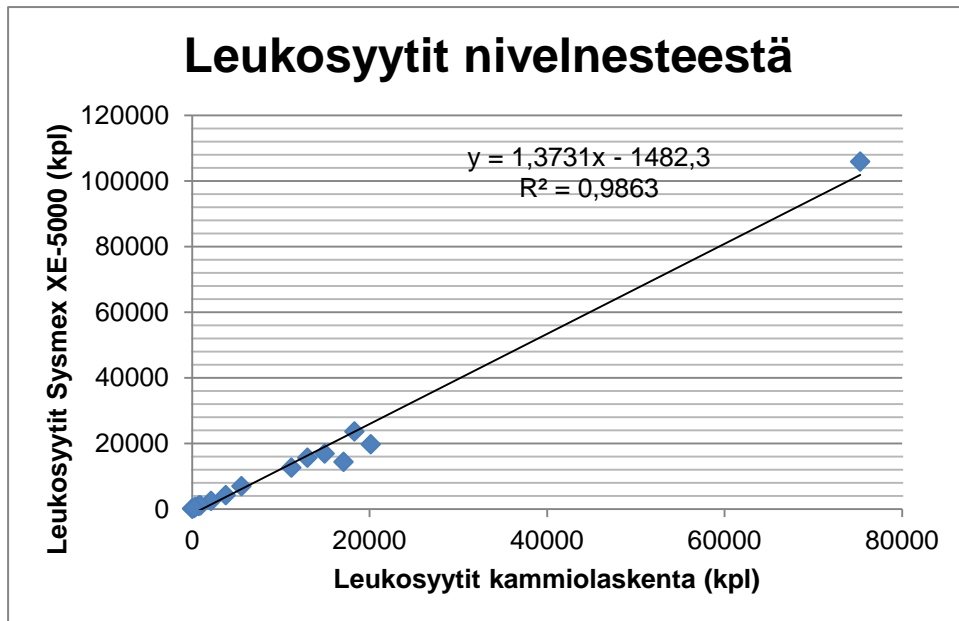
KUVIO 12. Regressiosuora selkäydinnesteen erytrosyyteistä (n=18)

Näytteet 14, 15 ja 16 erottuvat solumääriltään selkeästi muista selkäydinnesteenäytteistä (kuvio 12, s. 46). Kyseiset näytteet ovat samasta potilaasta eri putkiin otettuja näytteitä, jotka on laskettu artefaktavuodon poissulkemiseksi. Voidaan ajatella, että näytteet 14, 15 ja 16 ovat rinnakkaisia ja sinällään keskenään vertailukelpoisia. Kuitenkin regressiosuoran ja korrelaation kannalta näytteitä tulisi mieluummin käsitellä yhtenä näytteenä. Solumääriltään keskitasoisten näytteiden puuttuminen aiheuttaa valheellisen hyvän korrelaation 0,999 eikä ole siten luotettava. Tällä otoskoolla ja hajonnalla tuloksista ei voi tehdä johtopäätöksiä.



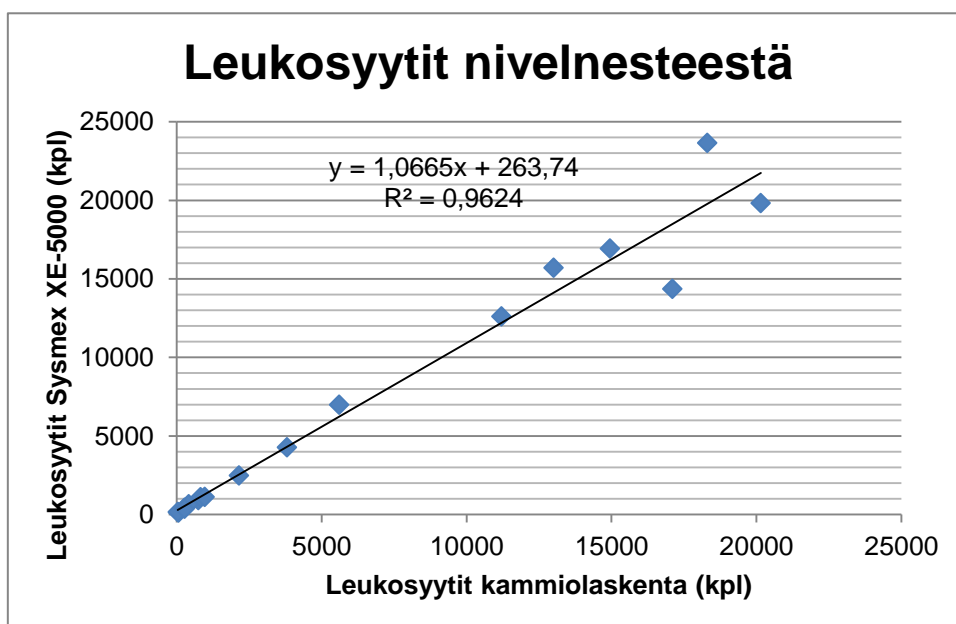
KUVIO 13. Selkäydinnesteen erytrosyytit ilman näytteitä 14,15 ja 16 (n=15)

Halusimme tehdä regressiosuoran myös ilman näytteitä 14, 15 ja 16, mutta solumääriltään keskitasoiset näytteet puuttuvat otoksesta ja Sysmex XE-5000 -analysaattorin osalta erytrosyyttimääriltään pieniä näytteitä ei ole (kuvio 13). Regressiosuoran määrittäminen ja korrelaation laskeminen ei ole mahdollista, koska Sysmex XE-5000 -analysaattori ei ole löytänyt näytteistä erytrosyyttejä.



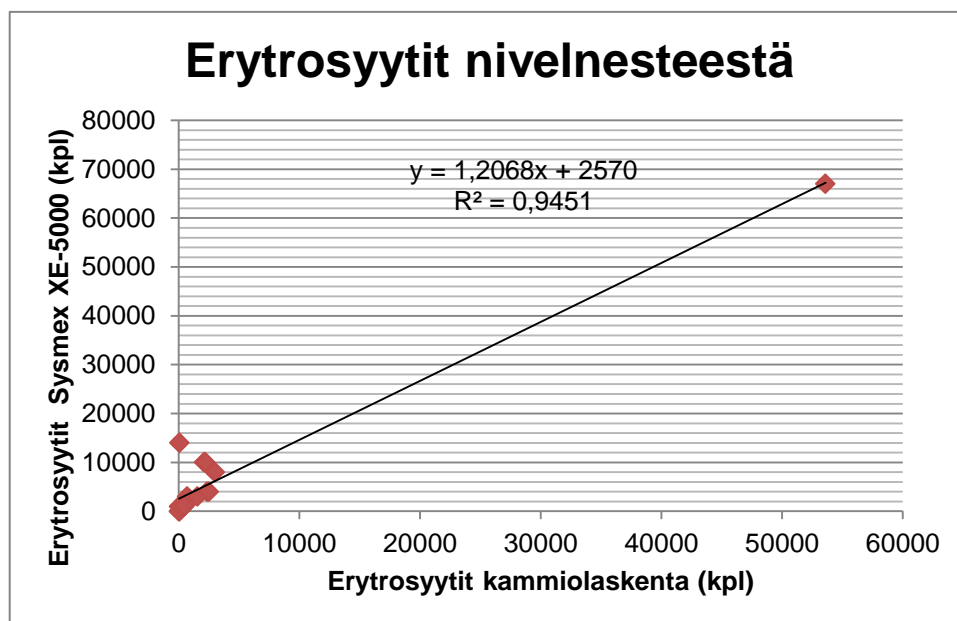
KUVIO 14. Regressiosuora nivelnesteen leukosyyteistä (n=18)

Näyte 7 poikkeaa leukosyyttimäärältään selvästi muista nivelnesteenäytteistä. Nivelnesteenäytteiden tuloksissa on enemmän hajontaa kuin selkäydinnesteenäytteissä ja otoksessa on myös solumäärältään pieniä ja keskitasoisia näytteitä (kuvio 14). Näyte 7 asettuu samalle regressiosuoralle muiden näytteiden kanssa, mutta yksittäisen korkean tuloksen perusteella ei voi tehdä yleistettävissä olevia johtopäätöksiä. Näyte 7, joka sisältää paljon leukosyyttejä, vääristää regressiosuoraa. Ilman suurempaa otoskokoa emme voi tietää miten muut paljon soluja sisältävät näytteet asettuisivat suoralle.



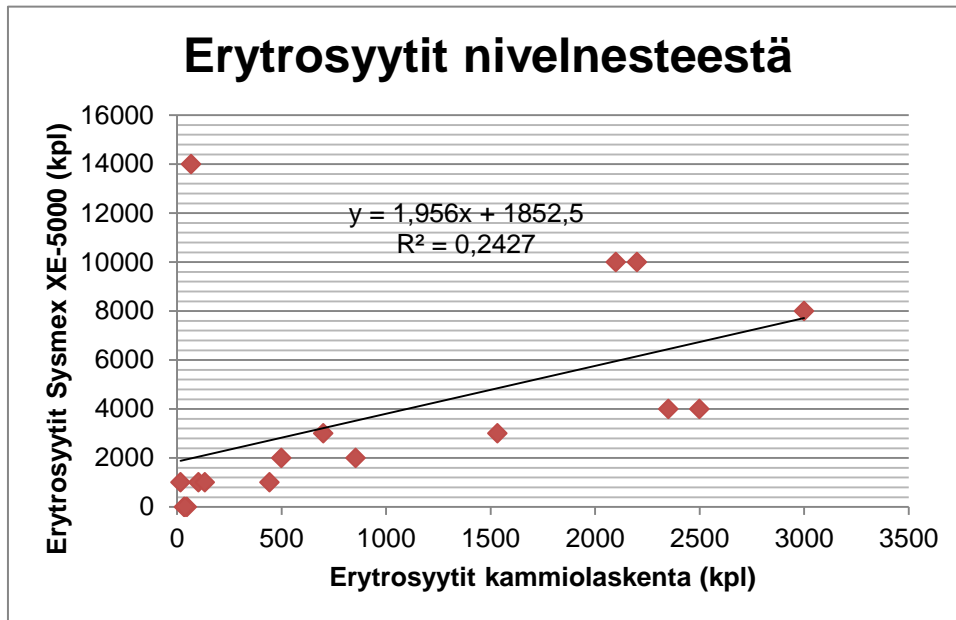
KUVIO 15. Regressiosuora nivelnesteen leukosyyteistä ilman näytettä 7 (n=17)

Kuviossa 15 (s. 48) on regressiosuora ilman näytettä 7. Muiden näytteiden tulokset asettuvat suoralle hyvin ja viitteitä lineaarisesta riippuvuudesta on havaittavissa. Kammiolaskennan ja Sysmex XE-5000 -analysaattorin antamien tulosten välinen korrelaatio leukosyyteille nivelnesteestä on 0,993. Näyte 7 nostaa korrelaatiota virheellisesti. Korrelaatio ilman näytettä 7 on 0,981. Pienellä otoskoolla korrelaatiot eivät kuitenkaan ole luotettavia.



KUVIO 16. Regressiosuora nivelnesteeseen erytrosyyteistä (n=18)

Näyte 5 erottuu muista nivelnesteinäytteistä runsaan erytrosyyttimääränsä vuoksi (kuvio 16). Otoksesta puuttuu solumääriltään keskitasoiset näytteet ja runsassoluisia näytteitä on vain yksi. Solumäärältään korkea näyte 5 vääristää regressiosuoraa eikä suora siten ole luotettava. Kammiolaskennan ja Sysmex XE-5000 -analysaattorin antamien tulosten välinen korrelaatio erytrosyyteille nivelnesteestä on 0,972. Koska otoksessa ei ole mukana muita solumääriltään korkeita näytteitä, ei tuloksista voi tehdä yleistettävissä olevia johtopäätöksiä.



KUVIO 17. Regressiosuora nivelnesteen erytrosyyteistä ilman näytettä 5 (n=17)

Teimme regressiosuoran myös ilman näytettä 5 (kuvio 17). Tässä kuviossa näyte 8 erottuu muista näytteistä. Sysmex XE-5000 -analysaattori on laskenut huomattavasti enemmän erytrosyyttejä kuin mitä kammiolaskennassa on löydetty. Sysmex XE -5000 -analysaattori on saattanut laskea erytrosyytteihin synoviosyyttien jäänteitä tai bakteereita, mikä saattaa selittää menetelmien väliset tuloserot näytteen 8 kohdalla. Muut pisteet asettuvat suoralle kohtalaisesti. Viitteitä lineaarisuudesta on havaittavissa, mutta pisteiden välillä on myös hajontaa. Tällä otoskoolla tuloksista ei tehdä johtopäätöksiä. Korrelaatio ilman näytettä 5 on 0,493. Korrelaatiota laskee näyte 8, jossa eri menetelmien väliset tulokset eroavat toisistaan huomattavasti.

Tarkoituksena oli saada kattava otos eritasoisia näytteitä vertailuun, mutta otoksesta puuttuu selkäydinnesteen osalta solumääriltään keskitasoiset näytteet ja nivelnesteen osalta niitä on vain vähän. Solumääriltään korkeita näytteitä saimme molempien näytemuotojen osalta vain muutamia ja niiden takia regressiosuorat muodostuivat virheellisiksi. Solumääriltään pieniä näytteitä oli otoksessa eniten. Sysmex XE-5000 -analysaattorin ilmoittama pieni erytrosyyttien mittayksikkö aiheuttaa sen, että otoksessamme on etenkin selkäydinnesteenäytteissä paljon nollatuloksia. Jatkoimme näytteiden keräystä vertailua varten aiottua pidempään, koska huomasimme että otoskoko jää pieneksi. Vaikka otoskoko olisikin ollut isompi, emme tiedä olisiko vertailuun saatu siitä huolimatta kattavasti eritasoisia näytteitä.

Sysmex XE-5000 -analysaattorilla korkea solumäärä aiheuttaa @ -liputuksen lineaarisuuden ylittävistä tuloksesta. Vertailussa Sysmex XE-5000 -analysaattori on liputtanut korkeita solumääriä vain leukosyyttien kohdalla. Erytrosyyttien kohdalla analysaattorin ilmoittama mittayksikkö on niin pieni, $10^6/\mu\text{l}$, että lineaarisuuden ylittäviä tuloksia ei ole. Sysmex XE-5000 -analysaattorin antamat erytrosyyttitulokset pitää kertoa 1000000, jotta tulos vastaisi kammiolaskennan tuloksia, $10^6/\text{l}$. Vertailussa mukana olevat erytrosyyttitulokset on ilmoitettu yksikössä $10^6/\text{l}$. Tästä johtuen erytrosyyttien kohdalla Sysmex XE-5000 -analysaattorin pienin antama tulos on $1000 \times 10^6/\text{l}$. Koska analysaattorin ilmoittama mittayksikkö on pieni, niin matalat erytrosyyttimäärät eivät tule vastatuksi. Matalat solumäärät, joilla olisi potilaan hoidon kannalta merkitystä, pyörisivät mittayksiköstä johtuen nollassi. Tällöin laskennallinen tulos ei anna oikeaa vastausta pienillä solumäärillä. Ennen kuin Sysmex XE-5000 -analysaattorilla saadaan tarkempia erytrosyyttituloksia, ei punktionesteiden tutkimisessa voida siirtyä sen käyttöön.

Sysmex XE-5000 -analysaattori liputti näytteistä, joiden leukosyyttimäärä ylitti lineaarisuuden. Tällöin näyte tulisi laimentaa luotettavan tuloksen saamiseksi. Otoksessamme lineaarisuuden ylittäviä näytteitä oli ainoastaan nivelnestenäytteissä. Tämä ei tarkoita, ettei selkäydinnestenäytteissä voisi myös olla lineaarisuuden ylittäviä leukosyyttituloksia. Tällaisia ei vain sattunut mukaan otokseemme. Joidenkin nivelnesteiden osalta ongelmaksi osoittautui myös näytteiden korkea viskositeetti. Tällaisten näytteiden solut laskettiin vain kammiossa analysaattorin tukkeutumisvaaran vuoksi. Ilman esikäsitteilyä viskositeetiltaan korkeita nivelnestenäytteitä ei voida tutkia Sysmex XE-5000 -analysaattorilla. Kammiolaskentaa varten Seinäjoen keskussairaalan kliinisen kemian yksikössä viskositeetiltaan korkeat nivelnestenäytteet laimennettiin fysiologisella keittosuolalla. Tarkoituksena oli mahdollistaa näytteen pipetointi kammioon ja varmistaa, että solut ovat kammiossa yhdessä kerroksessa ja ne voitiin laskea. Analysaattorille näytettä täytyy laimentaa, jotta näytteen solumäärä olisi analysaattorin mittausrajojen sisällä ja siten luotettava. Tämä ei poista tukkeutumisen mahdollisuutta. Analysaattorille näytteen viskositeettia tulisi vähentää muilla menetelmillä.

9 POHDINTA

Aiheemme vaihtui perehdytysmateriaalin teosta syksyn 2010 aikana ja työmme aihe varmistui nykyiseksi vasta marraskuussa 2010. Alkuun emme olleet kovin innostuneita aiheen vaihdosta, varsinkin kun tutkimusmenetelmä vaihtui toiminnallisesta opinnäytetyöstä kokeelliseen. Pikkuhiljaa aihe alkoi kuitenkin miellyttää entistä enemmän. Kun olimme päässeet kokeelliseen osuuteen saakka, olimme jo innoissamme aiheesta. Vertailun pieni otoskoko harmitti, koska olimme halunneet saada hyödynnettävissä olevia tuloksia. Pienen otoskoon takia emme päässeet täysin työmme tavoitteeseen. Tuottamamme tiedon perusteella Seinäjoen keskussairaalan klinisen kemian yksikön henkilökunta ei voi tehdä päätöstä Sysmex XE-5000 -analysaattorin käyttöön siirtymisestä punktionesteiden solututkimuksissa.

Selkäydinneste- ja nivelnestenäytteet laskettiin kammiossa Etelä-Pohjanmaan sairaanhoitopiirin työohjeiden mukaan ja mahdollisimman nopeasti luotettavien tulosten saamiseksi. Vertailtavat punktionestenäytteet analysoitiin Sysmex XE-5000 -analysaattorilla laitevalmistajan ja laboratorion ohjeita noudattaen kammiolaskennan jälkeen. Näytteiden huonosta säilyvyydestä johtuen kerättävät näytteet analysoi eritelaboratorion henkilökunta, joka muutenkin vastaa kammiolaskennan potilastulokset. Itse emme laskeneet punktionesteiden soluja laskentakammioista. Muutamia näytteitä analysoimme Sysmex XE-5000 -analysaattorilla. Koska emme voineet analysoida näytteitä itse, on meidän luotettava laboratorion henkilökunnan ammattitaitoon ja siihen, että näytteet tutkittiin ohjeita noudattaen. Työmme toistettavuus ja luotettavuus perustuu työohjeiden noudattamiseen ja tulosten huolelliseen dokumentointiin tutkimuksen joka vaiheessa. Työssämme kerrotut työskentelytavat koskevat Seinäjoen keskussairaalan klinisen kemian yksikköä.

Havainnointilomakkeeseen ei kirjattu potilaan tunnistetietoja eikä yksittäistä potilasta voi erottaa potilasaineistosta. Emme tiedä miltä osastoilta näytteitä vertailuun saimme. Potilaan taustoilla ja näytteen ottavalla osastolla ei ollut merkitystä tutkimuksemme kannalta. Näitä tietoja ei ole kirjattu mihinkään ja potilasta on mahdotonta tunnistaa tulosten perusteella. Näytteitä ei myöskään valittu vertai-

luun solumäärien, värin tai sameuden perusteella. Karsimme vertailusta ainoastaan näytteet, joista ei saatu lainkaan tulosta Sysmex XE-5000 -analysaattorilla ja yhden näytteen, joka oli sentrifugoitu ennen vertailua. Sysmex XE-5000 -analysaattorin tulosteista tarkastelimme vain näytteiden kokonaissolumääriä. Emme kiinnittäneet huomiota leukosyyttien erittelylaskentaan ja sirontakuvioon emmekä erytrosyyttien jakauman kuvaajaan.

Saamiamme tuloksia analysoimme Excel- ja Tixel- taulukkolaskentaohjelmilla. Aineiston analysoinnin apuna käytimme korrelaatio-, regressio- ja keskiarvoanalyysia. Mielestämme valitsemamme aineiston analysointimenetelmät olivat vertailevaan ja kokeelliseen tutkimusmenetelmäämme sopivia. Näiden analysointimenetelmien avulla saatiin viitteitä kammiolaskennan ja Sysmex XE-5000 -analysaattorin tulosten välisestä lineaarisuudesta, mutta tällä otoskoolla tulokset eivät ole luotettavia. Pienestä otoskoosta johtuen yksittäisten näytteiden tulokset vääristivät koko otoksen analysoinnin tuloksia. Jälkikäteen arvioiden analysointimenetelmät eivät ole tutkimuksessamme tällä otoskoolla toimivia. Pohdimme myös vaihtoehtoisia analysointimenetelmiä, mutta tutkimuksemme sopivia ei ollut.

Sameuden ja värin perusteella voidaan tehdä joitakin oletuksia näytteen solumääristä. Luotettavia johtopäätöksiä niiden perusteella ei kuitenkaan voi tehdä, koska muutkin tekijät vaikuttavat näytteen ulkonäköön. Osana Solut -tutkimusta sameuden ja värin arvioinnilla on merkitystä muun diagnostiikan tukena. Solumäärien keskiarvojen vertaaminen näytteen väriin ja sameuteen ei antanut lisäinformaatiota tutkimuksellemme.

Tutkimuksemme luotettavuutta vähentää vertailtujen näytteiden pieni määrä. Valitsimme selkäydin- ja nivelnesteiden vertailun kohteiksi, koska ne ovat erityyppisiä nesteitä ja niitä saapuu Seinäjoen keskussairaalan kliinisen kemian laboratorioon tilastojen mukaan eniten. Kesän aikana osastojen toimintaa oli kuitenkin supistettu, mikä vähensi näytemäärää. Keräsimme näytteitä maaliskuun 2011 puolivälistä heinäkuun 2011 loppuun asti. Vertailtavia näytteitä saimme vähän, koska punktionesteiden analysointiin Sysmex XE-5000 -analysaattorilla oli perehdytetty vain muutama työntekijä. Lisäksi selkäydinneste- ja nivelneste näytteitä saapuu laboratorioon yleensä iltapäivällä, jolloin eritelaboratoriossa

saattoi olla vain yksi työntekijä. Iltapäivisin Seinäjoen keskussairaalan klinisen kemian laboratorioon saapuu maakunnista kuljetuksia, joissa on hajautetun näytteenoton näytteitä. Saapuvien verinäytteiden runsaan määrän vuoksi molemmat Sysmex XE-5000 -verenkuva-analysaattorit ovat täydessä käytössä, jolloin analysointi punktionesteohjelmalla ei ole mahdollista. Viskositeetiltaan korkeita näytteitä ei analysoitu Sysmex XE-5000 -analysaattorilla tukkeutumisvaaran vuoksi, mikä vääristää otosta. *Background Check* -ohjelman suorittaminen taas lisää vertailumme luotettavuutta, koska carry over -virheen mahdollisuus pienenee.

Vertailua tehdessä käytettiin jonkin aikaa vanhentuneita kontrolleja. Avatut kontrollit säilyvät käyttökelpoisina 30 päivän ajan, mutta yhden kontrollipakkauksen kontrollipullopärisä käytettiin noin kolmen kuukauden ajan. Kontrollitulokset pysyivät kuitenkin vaihteluvälien sisällä. Valmistajan ilmoittamat vaihteluvälit ovat suuret, joten tulokset voivat erota toisistaan huomattavasti ja pysyä silti vaihteluvälien sisällä. Jos menetelmä otetaan käyttöön punktionestetutkimuksiin, laboratorion täytyy määrittää omat tiukemmat tavoitearvonsa kontrollituloksille.

Kammiolaskenta on subjektiivista, joten tutkimuksemme luotettavuutta olisi parantanut, jos useampi työntekijä olisi tehnyt vertailua. Emme kuitenkaan usko eri työntekijöiden saamien tulosten eroavan niin paljon keskenään, että ne olisivat vaikuttaneet vertailun tuloksiin. Koska vertailua tehneet työntekijät vastaavat myös potilastulokset, ei huomattavaa eroa vastausten välillä saa olla. Näytteitä ja niiden analysoinnissa käytettyjä välineitä käsitellessä tulee ottaa huomioon niiden mahdollinen tartuntavaarallisuus ja noudattaa huolellisia ja turvallisia työskentelytapoja. Tulosten luotettavuutta lisää laskentakammioiden huolellinen puhdistus ja huolto.

Vertailua joihinkin edellisiin tutkimuksiin vaikeuttaa vertailuissa käytetyt eri laitetypit. *Clinical Biochemistry* -lehdessä (2009, 42, 684 - 691) julkaistussa saksalaisessa tutkimuksessa havaittiin, että Sysmex XE-5000 -analysaattori tunnistaa hyvin selkäydinnesteen leukosyytit verrattuna kammiolaskennan tuloksiin. Myös meidän tuloksemme antavat viitteitä tulosten vertailtavuudesta leukosyyttien osalta. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* -lehdessä (2010, 48, 665 - 675) julkaistiin hollantilainen tutkimus punktionesteistä, jossa todettiin Sysmex

XE-5000 -analysaattorin ja kammiolaskennan tulosten olevan hyvin lineaarisia ja vertailukelpoisia keskenään. Viitteitä lineaarisuudesta oli havaittavissa erytrosyyttien ja leukosyyttien kohdalla myös meidän vertailussamme. Molemmissa Sysmex XE-5000 -analysaattorilla ja kammiolaskennasta tehdyissä tutkimuksissa huomattiin myös, että analysaattorin laskemat leukosyyttiarvot ovat korkeampia kuin kammiolaskennalla saadut tulokset. Tällaista ei aineistostamme käy ilmi. Opinnäytetyömme tuloksia ei ole kuitenkaan järkevää vertailla aikaisempien tutkimusten tuloksiin, koska otoskokomme on niin pieni. Jotkut tuloksistamme ovat otoskoosta huolimatta linjassa aikaisempien tutkimusten kanssa. Selkäydinneste- ja nivelnestenäytteitä voidaan tutkia Sysmex XE-5000 -analysaattorilla, mutta tulosten luotettavuudesta ei otoskokomme takia voi tehdä johtopäätöksiä.

Suurimpana epäkohtana Sysmex XE-5000 -analysaattorin punktionestetutkimuksissa pidämme erytrosyyttien pientä mittayksikköä, $10^6/\mu\text{l}$. Mittayksiköstä johtuen saamamme tulokset on jouduttu kertomaan 1000000, jotta yksikkö vastaisi kammiolaskennasta saatua yksikköä, jolla myös vastataan potilastulokset. Tällä mittayksiköllä näytteiden matalat erytrosyyttimäärät jäävät vastaamatta. Vertailussa yhdessä selkäydinnestenäytteessä oli kammiolaskennan mukaan 301 erytrosyyttiä ja Sysmex XE-5000 -analysaattori antoi tulokseksi nolla. Myös matalien erytrosyyttimäärien löytäminen on diagnostiselta kannalta merkittävää. Ennen kuin Sysmex XE-5000 -analysaattori pystyy vastaamaan myös matalat erytrosyyttimäärät, ei sen käyttöä punktionestetutkimuksissa voida harkita.

Suomeksi on joitakin artikkeleita punktionesteistä ja niiden tutkimisesta, mutta kirjoja aiheesta ei ole. Tämän takia lähdemateriaalin löytäminen oli aluksi haastavaa. Olemme käyttäneet työssämme englanninkielistä kirjallisuutta. Käyttämämme lähteet ovat mahdollisimman uusia. Oman haasteensa työn tekemiselle aiheutti se, että olimme ammattitaitoa edistävässä harjoittelussa Seinäjoen keskussairaalassa 1.10.2010 - 28.2.2011 ja meillä ei ollut käytettävissä koulumme kirjastoa Tampereella. Käytimme Etelä-Pohjanmaan sairaanhoitopiirin työohjeita lähteinä, koska työmme on tehty Seinäjoen keskussairaalan klinisen kemian yksikköön. Olemme kunnioittaneet tekijänoikeuksia kysymällä lupaa kammiolaskentakuvan ja Sysmex XE-5000 -analysaattorin tulosteen käyttöön.

Opinnäytetyöprosessin aikana syvensimme tietämystämme punktionesteistä ja niiden tutkimusmenetelmistä sekä teoriassa että käytännössä. Opimme myös kuinka kliinisessä laboratoriossa tutkitaan uuden tutkimusmenetelmän luotettavuutta mahdollista käyttöönottoa varten. Saimme hyvän käsityksen menetelmävertailun toteuttamisesta. Uskomme että näistä tiedoista ja taidoista on meille hyötyä tulevaisuudessa työelämässä. Korrelaatioiden laskeminen ja regressiosuorien tekeminen oli molemmille uutta ja ilman lehtori Jouko Suihkosen apua olisivat ne jääneet tekemättä. Opimme prosessityöskentelyä ja pääsimme tekemään yhteistyötä eri ammattiryhmien kanssa. Yhteistyö työelämän edustajien ja ohjaavien opettajien kanssa sujui hyvässä hengessä. Haluamme kiittää ylikemisti Kari Åkermania mielenkiintoisesta opinnäytetyön aiheesta. Erityiskiitoksen ansaitsee myös laboratoriohoitaja Seija Keskikiikonen opinnäytetyömme kokeellisen osuuden eteen tekemästään työstä.

Opinnäytetyöntekijöiden yhteistyö sujui loistavasti. Molemmilla oli alusta saakka samanlaiset näkemykset työn sisällöstä ja rakenteesta sekä tavoitteet opinnäytetyölle olivat yhtä korkealla. Molemmat osallistuivat opinnäytetyön tekemiseen yhtä paljon ja suurin osa työstä kirjoitettiin yhdessä. Osasimme hyödyntää opinnäytetyön tekemisessä molempien tekijöiden vahvuuksia.

Opinnäytetyömme tuloksia voisi hyödyntää jatkamalla tutkimusaineiston keräämistä suuremman ja kattavamman otoskoon saamiseksi. Jatkotutkimusaiheina voisi selvittää muiden punktionesteiden soveltuvuuden Sysmex XE-5000 -analysaattorille. Voitaisiin myös tutkia, voisiko nivelnestenäytteiden korkeaa viskositeettiä vähentää hyaluronidaasi- tai lämpökäsittelyn avulla, jotta ne soveltuisivat Sysmex XE-5000 -analysaattorille tutkittavaksi. Jatkossa voitaisiin myös selvittää, onko Sysmex XE-5000 -analysaattorin antama mono- ja polynukleaaristen leukosyyttien erittely riittävän tarkka, jotta sillä voitaisiin korvata sivelyvalmiste.

LÄHTEET

Anttila, P. 2006. Tutkiva toiminta ja ilmaisu, teos, tekeminen. 2. painos. Hamina: AKATIIMI Oy.

Bishop, M.L., Fody, E.P. & Schoeff, L. 2005. Clinical Chemistry. Principles, procedures, correlations. 5th Edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

Boer, K., Deufel, T. & Reinhoefer, M. 2009. Evaluation of the XE-5000 for the automated analysis of blood cells in cerebrospinal fluid. Clinical Biochemistry 42, 684 - 691.

Brunzel, N. A. 2004. Fundamentals of Urine and Body Fluid Analysis. 2nd Edition. Philadelphia: Saunders.

Clemente, C. 1984. Gray's anatomy of the human body. 30th edition. Philadelphia: Lea & Febiger.

Collins, L. 2009. Introduction. American Society for Clinical Laboratory Science. Clinical Laboratory Science 22(1), 45.

Eppendorf 5810R -sentrifugin käyttöohje. 2010. Etelä-Pohjanmaan sairaanhoitopiiri. Päivitetty 12.11.2010.

Eritelaboratorion työohje, laskukammioiden pesu. 2009. Etelä-Pohjanmaan sairaanhoitopiiri. Päivitetty 18.12.2009.

Ernvall, R., Ernvall, S. & Kaukkila, H-S. 2002. Tilastollisia menetelmiä sosiaali- ja terveysalalle. Helsinki: WSOY.

Estridge, B. H. & Reynolds, A. P. 2008. Basic Clinical Laboratory Techniques. 5th Edition. New York: Thomson Delmar Learning.

Etelä-Pohjanmaan sairaanhoitopiiri. Kliinisen kemian yksikkö. Luettu 23.11.2010. <http://www.epshp.fi/kotisivut/labnet/index.html>.

Freshney, R.I. 2005. Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Technique. 5th Edition. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.

Heikkilä, T. 2008. Tilastollinen tutkimus. Helsinki: Edita Prima Oy .

Hirsjärvi, S., Remes, P. & Sajavaara, P. 2007. Tutki ja kirjoita. 13. osin uudistettu painos. Keuruu: Otavan kirjapaino Oy.

Huollot Sysmex XE-5000, työohje. 2011. Etelä-Pohjanmaan sairaanhoitopiiri.

Janatuinen, S. 2006. Selkäydinneste ja sen kliiniset laboratoriotutkimukset: Normaalisti kirkasta –oppimateriaali. Bioanalytiikan koulutusohjelma. Pirkanmaan ammattikorkeakoulu. Opinnäytetyö.

de Jonge, R., Brouwer, R., de Graaf, M-T., Luitwieler, R-L., Fleming, C., de

Frankriker-Merkestiin, M., Sillevis-Smitt, P-A., Boonstra, J-G. & Lindemans, J. 2010. Evaluation of the new body fluid mode on the Sysmex XE-5000 for counting leukocytes and erythrocytes in cerebrospinal fluid and other body fluids. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 48, 665 - 675.

Karjalainen, L. 2004. Tilastomatematiikka. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy.

Kuusela, M. 2011. Sysmex XE-5000 analysaattori, mittausperiaatteet ja parametrit. Luentomateriaali. Power Point –esitys. Roche Diagnostics.

Käypä Hoito. Nivelreuma. 2009. Suomalaisen Lääkäriseuran Duodecimin ja Suomen Reumatologisen yhdistyksen asettama työryhmä.

Lalla, M. 2002. Punktionesteet: kemialliset tutkimukset. *Moodi* 1/2002, 42 - 43.

Li-perustutkimukset, työohje. 2009. Etelä-Pohjanmaan sairaanhoitopiiri. Päivitetty 10.3.2009.

Lo-laboroptik. Information about counting chamber (hemacytometer). Luettu 28.01.2011. <http://www.lo-laboroptik.de/englisch/info/info/html>.

Lumio, J. 2010. Aivokalvontulehdus (meningiitti). Lääkärikirja Duodecim. Tarkastettu 9.2.2010. Luettu 25.8.2011. http://www.terveyskirjasto.fi/terveyskirjasto/tk.koti?p_artikkeli=dlk00558.

Maltari, S. 2003. Virtsan partikkelilaskija Sysmex UF-100:n soveltuvuus liquorin ja pleuranesteen solujen tutkimiseen. Bioanalytiikan koulutusohjelma. Pirkanmaan ammattikorkeakoulu. Opinnäytetyö.

Nivelnestetutkimukset, työohje. 2009. Etelä-Pohjanmaan sairaanhoitopiiri. Päivitetty 10.3.2009.

Pirttilä, T. & Oksi, J. 2001. Tarvitaanko selkäydinneste tutkimuksia 2000-luvulla? *Suomen lääkirilehti* 14/2001, 1621-1626.

Penttilä, I. (toim.) 2004. Kliiniset laboratoriotutkimukset. Porvoo: WS Bookwell Oy.

Risteli, J. 2006. Nivelnesteen löydökset. *Moodi* 1/2006. 57-59.

Roche Diagnostics Oy. 2010. Sysmex XE 5000. Automaattinen hematologian analysaattori. Lyhyt käyttöohje.

Savolainen, E-R. 2006. Mitä uuden polven solulaskija pystyy tekemään? *Moodi* 1/2006, 14.

Savolainen, E-R. 2010. Solulaskenta. Teoksessa Niemelä, O. & Pulkki, K. (toim.) 2010. Laboratoriolääketiede. Kliininen kemia ja hematologia. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy.

Savolainen, E-R., Pelliniemi, T-T. & Koski, T. 2010. Hematologian analysaattorit. Virtaussytometria. Teoksessa Niemelä, O. & Pulkki, K. (toim.) 2010. Labora-

toriolääketiede. Kliininen kemia ja hematologia. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy.

Strasinger, S.K. & Di Lorenzo, M.S. 2001. Urinalysis and Body Fluids. 4th Edition. Philadelphia: F.A.Davis Company.

Suoniemi, S. & Suoniemi, T. 2003. Kammiolaskennalla ja AdviaTM 120 verenkuva-analysaattorin cerebrospinal fluid (CSF) –ohjelmalla määritettyjen likvorin solujen ja erittelylaskennan tulosten vertailua. Bioanalytiikan koulutusohjelma. Pirkanmaan ammattikorkeakoulu. Opinnäytetyö.

Tienhaara, A. 2002. Punktionesteet: solujen tutkiminen. Moodi 1/2002, 43 - 44.

Valli, R. 2001. Johdatus tilastolliseen tutkimukseen. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy.

Vilka, H. 2007. Tutki ja mittaa. Määrällisen tutkimuksen perusteet. Jyväskylä: Gummerus Kirjapaino Oy.

Vilpo, J. 2003. Kammiolaskenta. Teoksessa Vilpo, J. & Niemelä, O. (toim.) 2003. Laboratoriolääketiede. Kliininen kemia ja hematologia. Helsinki: Kandidaattikustannus Oy.

Opiskelemme Tampereen ammattikorkeakoulussa bioanalytiikkaa ja teemme opinnäytetyömme Seinäjoen keskussairaalan kliinisen kemian yksikköön. Opinnäytetyömme aihe on kammiossa laskettavista punktionesteistä tehtävien solututkimusten tulosten vertailu Sysmex XE 5000 -automaatilla saatuihin tuloksiin. Vertailu koskee likvor- ja nivelnestenäytteitä.

Toivomme teiltä apua vertailun käytännön osuuden suorittamisessa. Näytteiden huonosta säilyvyydestä johtuen nesteet tulisi analysoida mahdollisimman nopeasti luotettavien tulosten saamiseksi. Tarkoitus on tutkia näytteet kuten ennenkin ja sen lisäksi mahdollisuuksien mukaan analysoida Sysmex XE 5000 –analysaattorilla. Kammiolaskennan tulokset kirjataan ylös havainnointilomakkeille, joita on eritelaboratoriossa niille varatussa kansiossa. Analysaattorin tuloksista tulostetaan koneelta printti, joka niitataan yhteen havainnointilomakkeen kanssa. Likvorille ja nivelnesteelle on molemmille omat havainnointilomakkeet ja täytetyt lomakkeet voi laittaa samaan kansioon tyhjien lomakkeiden kanssa. Haluaisimme tiedon myös näytteistä, joita ei syystä tai toisesta ole analysoitu ollenkaan tai vain toisella menetelmistä. Kansiossa on oma lomake myös näille näytteille.

Tarkoituksena on kerätä aineistoa riittävän otoksen saamiseksi noin kahden kuukauden ajan. Kii-tämme teitä jo etukäteen avustanne opinnäytetyömme tekemisessä. Vastaamme mielellämme kysymyksiinne ja annamme lisätietoa työstämme.

Sähköpostiosoitteet: anne.paananen@piramk.fi, katri.puustinen@piramk.fi

Ystävällisin terveisin,

Anne Paananen ja Katri Puustinen.

(jatkuu)

LIKVOR

Sameus ennen
sentrifugointia 0 1 2 3

Väri ennen väritön keltainen kellertävä
sentrifugointia punertava punainen ruskea

Sameus sentrifugoinnin
jälkeen 0 1 2 3

Väri sentrifugoinnin väritön keltainen kellertävä
jälkeen punertava punainen ruskea

KAMMIOLASKENTA

Leukosyytit yht. _____ $10^6/l$ Erytrosyytit _____ $10^6/l$
(samat tulokset, jotka vastataan Efficaan)

Jos näytettä ei voida analysoida, miksi? _____

SYSMEX XE-5000

Tulosta Sysmexin antamat tulokset koneelta, ja niittaa paperi yhteen tämän paperin kanssa.

Jos näytettä ei voida analysoida, miksi? _____

Muuta huomioitavaa: _____

_____.

NIVELNESTE

Näytteen sameus 0 1 2 3

Näytteen väri väritön keltainen kellertävä
 punertava punainen ruskea

KAMMIOLASKENTA

Leukosyytit yht. _____ $10^6/l$ Erytrosyytit _____ $10^6/l$
(samat tulokset, jotka vastataan Efficaan)

Onko näyte laimennettu: kyllä ei

Jos näytettä ei voida analysoida, miksi? _____

SYSMEX XE-5000

Tulosta Sysmexin antamat tulokset koneelta, ja niittaa paperi yhteen tämän paperin kanssa.

Jos näytettä ei voida analysoida, miksi? _____

Muuta huomioitavaa: _____

[illegible]

LIITE 2: 1(2)

Kontrollitulokset, taso 1. Cell-Chex™ Auto Body Fluid Cell Count Control

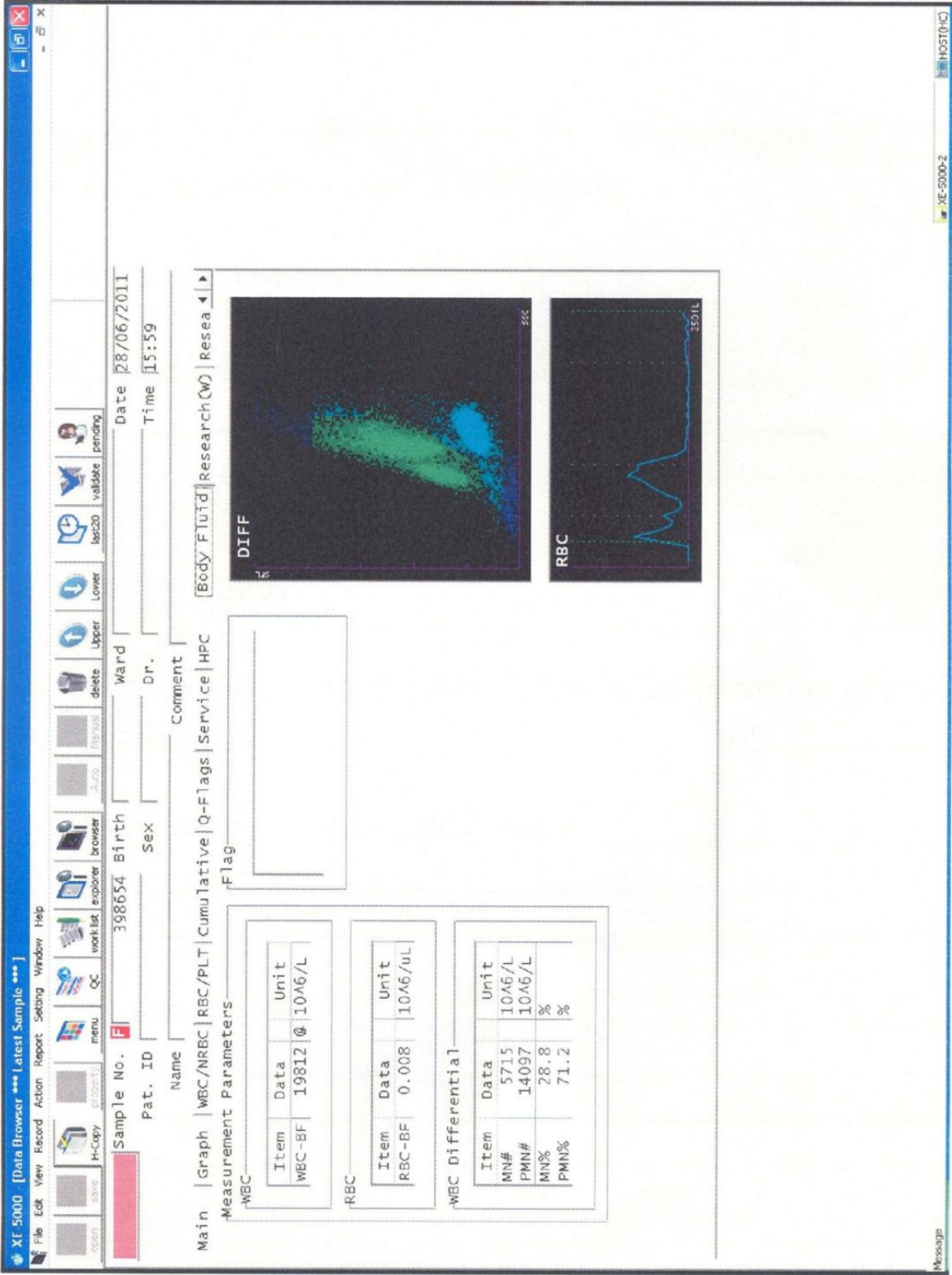
	WBC-BF 10⁶/l	RBC-BF 10⁶/μl (= 10⁶/l)	MN %	PMN %
<i>Tavoitearvot</i>	83 (+/- 30)	0.025 (+/- 0.010)	34.00 (+/- 32.00)	66.00 (+/- 32.00)
Kontrollinäytteen numero				
1	88	0.025 (25000)	34.1	65.9
2	78	0.025 (25000)	35.9	64.1
3	73	0.025 (25000)	39.7	60.3
4	71	0.025 (25000)	36.6	63.4
5	80	0.025(25000)	38.8	61.2
6	70	0.024 (24000)	37.1	62.9
7	82	0.026 (26000)	28.0	72.0
8	91	0.025 (25000)	45.1	54.9
9	74	0.025 (25000)	55.4	44.6
10	77	0.025 (25000)	24.7	75.3
11	73	0.025 (25000)	41.1	58.9
12	79	0.025 (25000)	39.2	60.8
13	72	0.023 (25000)	36.1	63.9
14	81	0.026 (26000)	35.8	64.2
15	87	0.025 (25000)	41.4	58.6
16	74	0.025 (25000)	36.5	63.5
17	78	0.025 (25000)	28.2	71.8
18	89	0.025 (25000)	41.6	58.4
19	64	0.026 (26000)	50.0	50.0
20	71	0.025 (25000)	29.6	70.4
21	79	0.025 (25000)	31.6	68.4
22	75	0.026 (26000)	33.3	66.7
23	86	0.026 (26000)	29.1	70.9
24	77	0.025 (25000)	40.3	59.7

Kontrollitulokset, taso 2. Cell-Chex™ Auto Body Fluid Cell Count Control

	WBC-BF 10⁶/l	RBC-BF 10⁶/μl (= 10⁶/l)	MN %	PMN %
<i>Tavoitearvot</i>	315 (+/- 70)	0.077 (+/- 0.020)	33.12 (+/- 14.00)	66.88 (+/- 14.00)
Kontrollinäytteen numero				
1	311	0.073 (73000)	34.1	65.9
2	304	0.075 (75000)	32.6	67.4
3	303	0.074 (74000)	35.3	64.7
4	311	0.076 (76000)	32.2	76.8
5	306	0.078 (78000)	36.6	63.4
6	313	0.074 (74000)	38.0	62.0
7	310	0.075 (75000)	34.8	65.2
8	329	0.076 (76000)	33.7	66.3
9	302	0.074 (74000)	33.8	66.2
10	291	0.076 (76000)	36.8	63.2
11	267	0.075 (75000)	34.8	65.2
12	284	0.074 (74000)	35.2	64.8
13	280	0.075 (75000)	35.0	65.0
14	311	0.075 (75000)	36.7	63.3
15	309	0.075 (75000)	37.5	62.5
16	305	0.073 (73000)	32.8	67.2
17	310	0.077 (77000)	35.5	64.5
18	310	0.075 (75000)	34.5	65.5
19	318	0.076 (76000)	35.2	64.8
20	325	0.076 (76000)	33.5	66.5
21	325	0.076 (76000)	33.8	66.2
22	299	0.076 (76000)	35.1	64.9
23	324	0.078 (78000)	34.9	65.1
24	320	0.074 (74000)	35.6	64.4

Esimerkki Sysmex XE-5000 –analysaattorin tulosteesta

XE-5000 HardCopy



LIITE 4: 1(4)

Selkäydinnesteenäytteiden solulaskennan tulokset

Näyte- numero	Leukosyytit kammio 10 ⁶ /l	Leukosyytit Sysmex 10 ⁶ /l	Erytrosyytit kammio 10 ⁶ /l	Erytrosyytit Sysmex 10 ⁶ /l (=10 ⁶ /μl)	Muuta huomioita- vaa
1	1	14	1	0 (0.000)	Kammiossa hajon- neita leukosyyttejä noin 600 x 10 ⁶
2	88	93	2	0 (0.000)	
3	2	2	0	0 (0.000)	
4	298	1048	3	0 (0.000)	
5	24	24	26	0 (0.000)	
6	1	2	1	0 (0.000)	
7	1	5	148	0 (0.000)	
8	2	1	31	0 (0.000)	
9	0	2	78	0 (0.000)	
10	0	5	0	0 (0.000)	
11	10	24	0	0 (0.000)	
12	1	3	8	0 (0.000)	
13	2	13	6	0 (0.0000)	
14	70	120	12960	14000 (0.014)	5. putki (sama potilas kuin nro 16 & 17)
15	83	115	12000	14000 (0.014)	4. putki (sama potilas kuin nro 16 & 17)
16	105	106	14150	15000 (0.015)	3. putki (sama potilas kuin nro 16 & 17)
17	4	12	301	0 (0.000)	
18	1	2	82	0 (0.000)	

2(4)

Selkäydinnestenäytteiden sameus ja väri

Näyte- numero	Sameus en- nen sentrifugoin- tia	Väri ennen sentrifugoin- tia	Sameus sentrifugoin- nin jälkeen	Väri sentrifugoin- nin jälkeen
1	0	1	0	1
2	0	1	0	1
3	0	1	0	1
4	1	2	0	2
5	0	1	0	1
6	0	1	0	1
7	0	1	0	1
8	0	1	0	1
9	0	1	0	1
10	0	1	0	1
11	0	1	0	1
12	0	1	0	1
13	0	1	0	1
14	2	5	0	2
15	2	5	0	2
16	2	5	0	2
17	1	1	0	1
18	0	1	0	1

Sameus 0-3:

0 Kirkas

1 Hieman samea

2 Melko samea

3 Hyvin samea

Väri:

1 Väritön

2 Keltainen

3 Kellertävä

4 Punertava

5 Punainen

6 Ruskea

3(4)

Nivelnestenäytteiden solulaskennan tulokset

Näyte- numero	Leukosyytit kammio 10 ⁶ /l	Leukosyytit Sysmex 10 ⁶ /l	Erytrosyytit kammio 10 ⁶ /l	Erytrosyytit Sysmex 10 ⁶ /l (=10 ⁶ /μl)	Muuta huomioita- vaa
1	745	908	855	2000 (0.002)	
2	13000	15708	500	2000 (0.002)	Leukosyyteissä @- liputus
3	11200	12597	700	3000 (0.003)	Leukosyyteissä @- liputus
4	265	417	103	1000 (0.001)	
5	3800	4278	53600	67000 (0.067)	Näyte laimennettu 1:20
6	5600	6977	2350	4000 (0.004)	
7	75300	105898	2100	10000 (0.010)	Näyte laimennettu 1:30, leukosyyteissä @-liputus
8	18300	23651	67	14000 (0.014)	Näyte laimennettu 1:20, leukosyyteissä @-liputus
9	405	638	34	0 (0.000)	
10	17100	14362	2200	10000 (0.010)	Leukosyyteissä @- liputus
11	14950	16927	17	1000 (0.001)	
12	20150	19812	3000	8000 (0.008)	
13	62	117	47	0 (0.000)	
14	31	150	38	0 (0.000)	
15	822	1093	1533	3000 (0.003)	Näyte laimennettu
16	2144	2473	2500	4000 (0.004)	Näyte laimennettu
17	967	1110	133	1000 (0.001)	
18	261	366	442	1000 (0.001)	

Nivelnestenäytteiden väri ja sameus

Näyte- numero	Sameus	Väri
1	2	3
2	3	2
3	3	2
4	1	3
5	3	5
6	2	2
7	3	3
8	3	2
9	1	2
10	3	2
11	3	2
12	3	2
13	1	3
14	0	3
15	2	2
16	2	2
17	1	2
18	1	2

Sameus 0-3:

0 Kirkas

1 Hieman samea

2 Melko samea

3 Hyvin samea

Väri:

1 Väritön

2 Keltainen

3 Kellertävä

4 Punertava

5 Punainen

6 Ruskea

LIITE 5

Näytteet, joita ei määritetty Sysmex XE-5000 -analysaattorilla

Selkäydinneste

3 näytettä	Näytettä ei riittänyt vertailuajoon
2 näytettä	Koneilla maakunnan verinäytteitä, joten punktionesteitä ei voi analysoida.

Nivelneste

4 näytettä	Näytteen viskositeetti liian korkea Sysmex XE-5000 –analysaattorille, näyte sakkainen
1 näyte	Viskositeetti niin korkea, ettei voi pipetoida. Solut kasoissa (tarkistettu mikroskoopissa)
2 näytettä	Näytettä ei riittänyt vertailuajoon
1 näyte	Putki sentrifugoitu ennen vertailuajoa, näytteeseen muodostunut sakkaa, joka ei enää liuennut sekoittamalla.

LIITE 6

Solumäärien keskiarvojen vertailu näytteiden sameuteen ja väriin

Selkäydinneste

sameus ennen sentrifugointia	0	1	2	3
leukosyytit kammiossa	10	151	86	-
leukosyytit Sysmex XE-5000	15	530	114	-
näytteet kpl	13	2	3	-

sameus sentrifugoinnin jäl- keen	0	1	2	3
leukosyytit kammiossa	39	-	-	-
leukosyytit Sysmex XE-5000	8815	-	-	-
näytteet kpl	18	-	-	-

väri ennen sentrifugointia	1	2	3	4	5	6
erytrosyytit kammiossa	49	3	-	-	13037	-
erytrosyytit Sysmex XE-5000	0	0	-	-	14333	-
näytteet kpl	14	1	-	-	3	-

väri sentrifugoinnin jälkeen	1	2	3	4	5	6
erytrosyytit kammiossa	49	9778	-	-	-	-
erytrosyytit Sysmex XE-5000	0	10750	-	-	-	-
näytteet kpl	14	4	-	-	-	-

Nivelneste

sameus	0	1	2	3
leukosyytit kammiossa	31	392	2328	21725
leukosyytit Sysmex XE-5000	150	530	2863	26654
näytteet kpl	13	2	3	8

väri	1	2	3	4	5	6
erytrosyytit kammiossa	-	1123	629	-	53600	-
erytrosyytit Sysmex XE-5000	-	4250	2600	-	67000	-
näytteet kpl	-	12	5	-	1	-